

CASO CLÍNICO

A LARINGITE NEUROGÉNICA E AS FIBRAS SENSITIVAS THE NEUROGENIC LARYNGITIS AND THE SENSITIVE NERVES

Manuel Lima-Rodrigues*,***, Ana Valle-Fernandes*, Joaquim Pinheiro***, Rui Nunes** e Armando Almeida*

RESUMO:

Neste estudo analisou-se, na mucosa da laringe do rato, a distribuição e morfologia dos plexos nervosos e fibras terminais imunorreactivas a dois importantes peptídeos presentes nos nervos sensitivos (CGRP e SP). A inervação formava redes densas de fibras finas com muitas varicosidades "en passant", distribuídas ao longo de toda a espessura do epitélio e no tecido conjuntivo subjacente, com uma maior densidade na metade posterior das cordas vocais e na face laringea da epiglote. O aspecto mais importante deste estudo foi a visualização de fibras a atravessarem a camada celular epitelial mais externa e a terminarem ao nível da camada de muco entre os cílios. Este facto sugere que, na ausência de muco, os terminais nervosos da laringe ficam expostos e podem ser estimulados directamente através de partículas em suspensão no ar inspirado. Assim, as fibras deverão contribuir para a inflamação neurogénica que resulta da libertação dos peptídeos e originar laringite.

PALAVRAS-CHAVE:

Substância P; Aferentes primários intraepiteliais; Mucosa laringea; Microscopia óptica

SUMMARY:

In this study we analysed, in the rat laryngeal mucosa, the distribution and morphology of the nervous plexus and afferent fibres immunoreactive to the most important peptides present in the sensitive nerves (CGRP and SP). The innervation formed a dense network of fine fibres with "en passant" varicosities across the epithelial thickness and in the adjacent connective tissue with higher density in the posterior half of the vocal folds and laryngeal aspect of the epiglottis. The most important feature was the visualisation of the fibres crossing the most superficial epithelial layer and terminating at the mucociliary level. This fact suggests that, in the absence of mucus, the inhaled irritants can directly stimulate the fibres. In this way, the fibres can participate in the neurogenic inflammation that results from the release of peptides and produce laryngitis.

KEY WORDS:

laryngitis; Neurogenic; Afferent fibres.

Dr. Manuel Lima Rodrigues

Escola de Ciências da Saúde, CP-II, Piso 3
Universidade do Minho - Campus de Gualtar - 4710-057 BRAGA - Portugal
Telf.: +351-253-604852 - Fax: +351-253-604820
Email: mlrodrigues@ecsau.de.uminho.pt

INTRODUÇÃO

O sistema sensitivo da laringe pode iniciar uma grande variedade de reflexos importantes para respostas fisiológicas relacionadas com funções vitais, nomeadamente a protecção das vias respiratórias.

O sistema interage com o sistema nervoso autónomo, tal como se pode observar pelas respostas reflexas que se observam após a estimulação mecânica da laringe, as quais podem conduzir, inclusivamente, à paragem cardíaca.

A maior parte da enervação sensitiva da faringe e da laringe é da responsabilidade do

* Instituto de Investigação em Ciências da Vida e da Saúde, Escola de Ciências da Saúde, Universidade do Minho.
** Faculdade de Medicina do Porto.
*** Centro Hospitalar do Alto Minho.

ramo laríngeo superior do nervo vago, apesar de outros nervos cranianos, tais como o trigémio e o glossofaríngeo, poderem também estar implicados (Widdicombe, 1996).

Se a origem no sistema nervoso central e a distribuição anatómica dos troncos nervosos principais da enervação laríngea estão bem documentadas, já no que diz respeito à microenervação intraepitelial da laringe os dados conhecidos são poucos e contraditórios em diferentes espécies animais. (Yoshida et al., 2000).

Há muito tempo que é sabido que a enervação sensitiva da laringe se localiza na mucosa (Stohr, 1957).

As fibras mielínicas e amielínicas que atingem o epitélio derivam de plexos localizados na submucosa, possuem numerosas varicosidades ao longo da sua extensão e terminam sob a forma de perfis axonais livres (Bradley, 2000).

Esta rede nervosa periférica é rica em peptídeos, dos quais os mais importantes são a substância P (SP) (Hisa et al, 1985) e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) (Tanaka et al, 1993; Hauser-Kronberger et al, 1994).

Apesar destes dois peptídeos poderem desempenhar outras funções (Hisa et al, 1998) e existirem outros peptídeos que podem ter um papel na enervação sensitiva da laringe (Yamamoto et al., 1997 1998, 2000), o CGRP e a SP são os mais bem estudados devido a terem uma grande importância na transmissão de informação nociceptiva para o sistema nervoso central (Millan, 1999).

As fibras sensitivas intraepiteliais da laringe não atingem o lume do sistema respiratório do homem, o que sugere que os irritantes que chegam à mucosa não estimulam directamente as fibras aferentes primárias (Villaverde e tal., 1994; Hauser-Kronberger et al., 1997).

Esta ausência foi também verificada noutras espécies (Yoshida et al., 2000; Ohgi e tal., 1994), incluindo o rato (Domeij et al., 1991),

onde as fibras chegam ao epitélio mas nenhuma descrição ou fotografia indica que possam atingir o lume do tracto respiratório.

No entanto, foram descritas fibras sensitivas ocasionais a atingir o lume da mucosa nasal (Hauser-Kronberger et al., 1997).

O presente estudo tem dois objectivos:

- (a) rever a morfologia e a localização da rede de aferentes primários intraepiteliais da mucosa do rato que possuem CGRP e SP;
- (b) dependendo do resultado desta 1ª parte do estudo, saber se seria possível desenvolver um modelo no rato para estudar a activação directa dos aferentes primários por substâncias transportadas pelas vias respiratórias que permitisse explicar a inflamação neurogénica, nomeadamente a laringite.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados cinco ratos do sexo feminino, com 60-80gr (idades compreendidas entre 20-40 dias), provenientes da colónia Wistar Han da Empresa Charles Rivers (Barcelona).

Os animais foram perfundidos sob anestesia (hidrato de cloral a 35% intraperitoneal) através da aorta ascendente com 1000ml do fixador Zamboni (paraformaldeído 2% e ácido picrico 1,5%).

A laringe foi removida e colocada no mesmo fixador durante 4 horas a 4°C e depois emersa durante a noite em sacarose a 30% (em PBS 0.1 M).

Realizaram-se em seguida cortes de congelação transversais com 50 mm de espessura num criostato, os quais foram submetidos a um protocolo imunocitoquímico para revelar a presença dos peptídeos CGRP e SP.

Cortes alternados foram incubados até ao dia seguinte, a 4°C, com anticorpo de coelho anti-CGRP (1:4000; Amersham, UK) ou anticorpo também de coelho anti-SP (1:4000;

Península Laboratories, Belmont, CA, USA), diluídos em PBS com 0,3% de tritonX-100 (PBST).

Depois de lavar em PBST, os cortes foram incubados durante 1 hora com um anticorpo de cabra anti-coelho biotinilado (1:200; Vector labs, USA) em PBST, lavados em PBST e depois incubados durante uma hora no complexo avidina-biotina (ABC-1:200; Vector labs, USA) em PBS.

Depois de lavada em PBS e em tampão tris-HCL a 0.1M, pH 7.4, a reacção antigénio-anticorpo foi visualizada numa solução contendo 10mg do cromogénio diaminobenzidina (DAB; Sigma) e 4ml de H₂O₂ em 20ml de solução tris-HCL.

Os cortes foram depois desidratados em estufa a 37°, lavados em xilol e montados em *entellan*.

Com o objectivo de determinar a especificidade da marcação de fibras imunoreactivas ao CGRP (CGRP-IR) ou à SP (SP-IR) efectuaram-

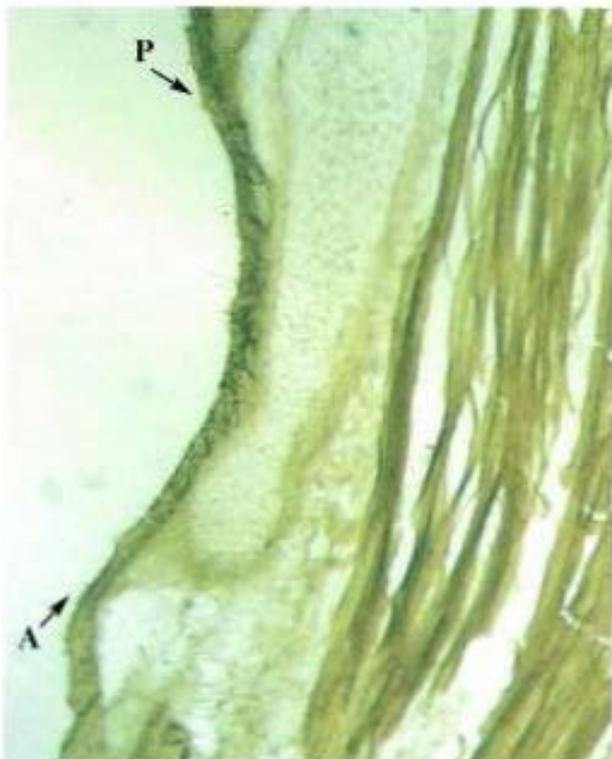


FIGURA 1- CORDA VOCAL COM DENSIDADE DECRESCENTE DE FIBRAS DO TERÇO POSTERIOR PARA O ANTERIOR. P- POSTERIOR • A- ANTERIOR

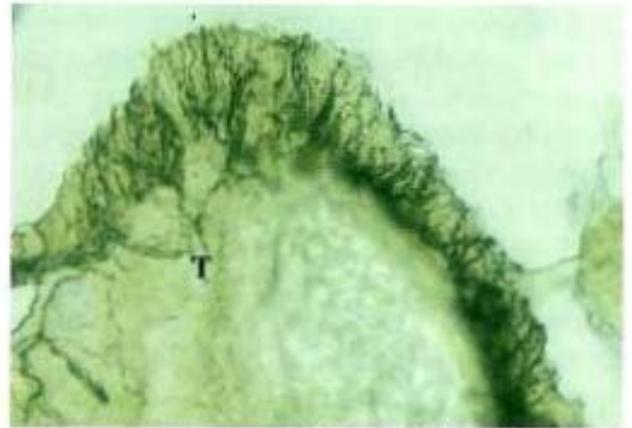


FIGURA 2A- PLEXO NERVOSO INTRAEPITELIAL E TRONCOS NERVOSOS (T) PROVENIENTES DO TECIDO CONJUNTIVO SUBJACENTE IMUNOREACTIVOS PARA A CGRP.

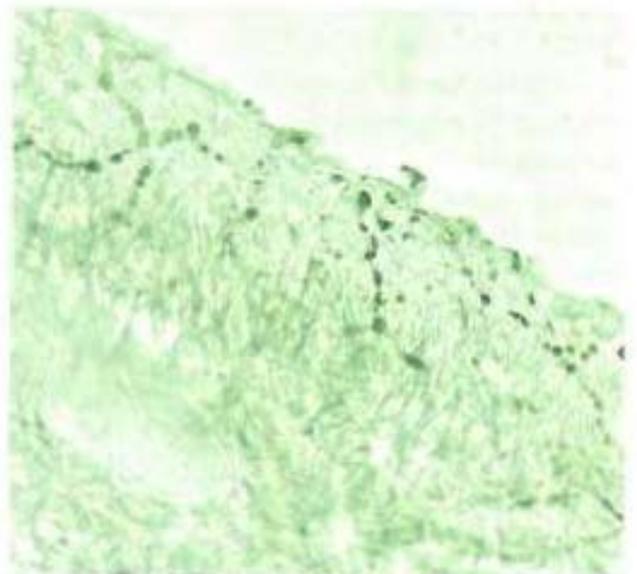


FIGURA 2B- PLEXO NERVOSO INTRAEPITELIAL IMUNOREACTIVO PARA A SP COM MENOR DENSIDADE QUE PARA CGRP.

-se, em cortes controlo, os mesmos protocolos imunocitoquímicos, mas em que os anticorpos primários foram retirados.

RESULTADOS

Observou-se um plexo muito denso de fibras nervosas CGRP-IR ao nível do epitélio da laringe do rato (Figs. 1-3).

Este plexo nervoso também era particularmente desenvolvido ao longo do epitélio das cordas vocais, verificando-se uma maior densidade na metade posterior a qual decrescia, progressivamente, na direcção anterior das cordas (Fig. 1).

A enervação CGRP-IR era também muito rica ao nível da face laríngea da epiglote, onde inclusivamente se puderam observar, bilateralmente, os troncos nervosos principais que a originavam (Fig. 4).

A outros níveis do epitélio também se podia observar que a rede nervosa intraepitelial derivava de troncos nervosos localizados nas zonas mais profundas do epitélio e do tecido conjuntivo da lâmina própria subjacente (Fig. 2A).

O plexo encontrava-se distribuído ao longo da superfície epitelial, com as fibras nervosas a revelarem uma aspecto semelhante às contas de um rosário devido às sucessivas varicosidades arredondadas "en passant" ao longo das fibras (Figs. 2B e 3).

A observação mais importante foi a de que a porção terminal das fibras, incluindo as suas varicosidades mais superficiais, atravessavam a camada mais superficial do epitélio e atingiam o lume das vias respiratórias, terminando ao nível da camada mucociliar (Figs. 2 e 3).

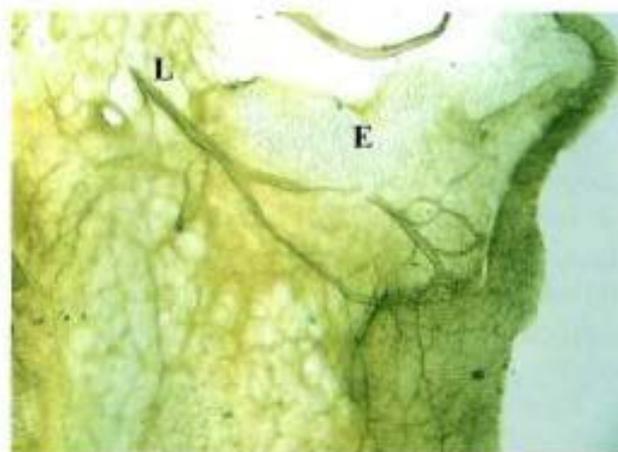


FIGURA 4- RAMO LARÍNGEO SUPERIOR E A SUA RAMIFICAÇÃO INTRAEPITELIAL AO NÍVEL DA CARTILAGEM EPIGLOTE. L- NERVO LARÍNGEO SUPERIOR • E- CARTILAGEM EPIGLOTE.

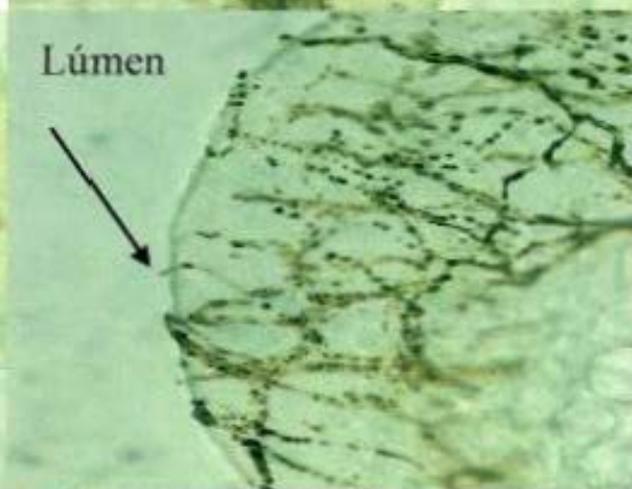
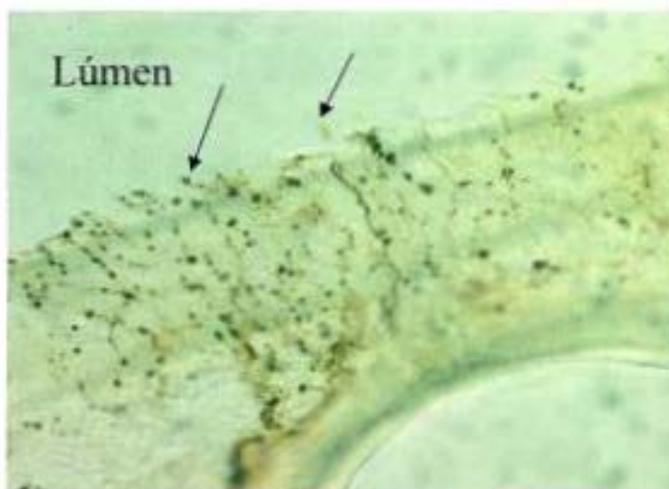
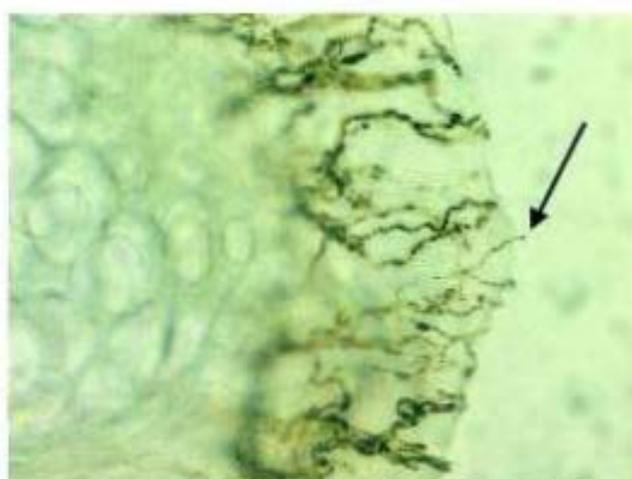


FIGURA 3- DISTRIBUIÇÃO INTRAEPITELIAL DAS FIBRAS. A OBSERVAÇÃO MAIS IMPORTANTE FOI A DE QUE: A PORÇÃO TERMINAL DAS FIBRAS, ATINGIAM O LÚMEN DAS VIAS RESPIRATÓRIAS, TERMINANDO AO NÍVEL DA CAMADA MUCOCILIAR.

A detecção de marcação SP-IR revelou um plexo nervoso intraepitelial com uma distribuição semelhante àquele imunoreactivo à CGRP, mas com uma menor densidade e com menos varicosidades ao longo das fibras (Fig. 4).

Foi possível verificar que os terminais nervosos também faziam saliência da superfície epitelial e atingiam o lume da laringe (Fig. 4).

Não foi detectada qualquer marcação de fibras aferentes primárias nos cortes controlo em que o anticorpo primário anti-CGRP ou anti-SP foram omitidos.

DISCUSSÃO

A enervação do epitélio da laringe

É sabido que, no rato, ocorre um plexo de fibras sensitivas amielínicas ao nível do epitélio respiratório, mais denso na zona basal mas com projecções que poderão ir até aos complexos juncionais (zona apical da membrana citoplasmática lateral), mas sem os ultrapassar (Domeij et al., 1991; Widdicombe, 1998).

Contudo, no nosso estudo, demonstrou-se que um grande número de fibras CGRP- e SP-IR, com sucessivas varicosidades redondas "en passant", faziam saliência no lume do tracto respiratório da laringe, ultrapassavam a linha epitelial mais externa e terminavam entre os cílios que projectam da superfície apical das células do epitélio da laringe.

Que seja do nosso conhecimento, este é um dado anatómico novo sobre a enervação sensitiva da laringe, ainda não descrito na laringe do Rato, Homem ou outra espécie estudada.

Em comparação com o estudo de Domeij e colaboradores (1991), também feito no rato, os nossos resultados podem reflectir:

- (i) o uso de animais muito mais novos (60-100 gr versus 250-400gr);
- (ii) diferenças na estirpe dos animais (Sprague-Dawley versus Wistar); e/ou
- (iii) diferenças no protocolo experimental seguido (visualização das fibras em fluo rescência versus campo claro).

É importante referir que estes dados poderão ajudar a perceber como é que as substâncias transportadas pelas vias aéreas podem estimular a mucosa do rato.

Sugerem que, na ausência de muco, as fibras ficam expostas e podem ser fácil e directamente estimuladas por estímulos nocivos, tais como aqueles causados pela acção de agentes inflamatórios ou irritantes exógenos (ex: fumo do tabaco).

Deste modo, a mucosa da laringe do rato pode constituir um bom modelo para o estudo da acção directa de factores nóxicos (inflamatórios, degenerativos e neoplásicos) sobre a enervação sensitiva (aferentes primários) do sistema respiratório.

Estudos de microscopia electrónica realizados no Homem (Villaverde e tal., 1994) e no cão (Ohgi e tal., 1994) mostraram que, na laringe, as fibras nervosas CGRP- e SP-IR não ultrapassavam os complexos juncionais que selam o espaço intercelular entre as porções mais apicais das membranas laterais de células epiteliais contíguas.

Deste modo, as fibras e varicosidades sensitivas terminais não atingiam o lume da laringe.

No Homem, foi observado um número muito reduzido de fibras a atingirem a superfície do epitélio da mucosa nasal (fig. 3A, Hauser-Kronberger e tal., 1997) e, em maior número, a superfície dos ductos excretores de glândulas mucosas sub-epiteliais, mas não o lume da laringe (Hauser-Kronberger e tal., 1997).

Estruturas denominadas corpos neuro-epiteliais (NEBs - grupos de células neuro-endócrinas), mas não as fibras nervosas que os enervam, surgem muitas vezes à superfície do epitélio e podem projectar para o próprio lume do tracto respiratório (Yu, 2002).

Além disso, as fibras que enervam os NEBs na laringe não são CGRP- ou SP-IR.

Fibras sensitivas CGRP- e SP-IR

Os neurónios sensitivos viscerais dos nervos vago e glossofaríngeo que enervam a mucosa

da laringe têm os pericários localizados, respectivamente, nos gânglios nodoso e petroso (Huang e tal., 1994; Yoshida e tal., 2000).

Foi demonstrada a presença de numerosos peptídeos nos aferentes primários provenientes das mucosas laringea e traqueal no Homem (Hauser-Kronberger e tal., 1994), Rato (Domeij e tal., 1991) Gato (Tanaka e tal., 1993; Rha e tal., 1994; Tanaka e tal., 1995) e Cão (Hisa e tal., 1994; Yoshio e tal., 2000).

No entanto, o CGRP e a SP são consideradas como os principais neuropeptídeos neurotransmissores existentes no sistema aferente primário proveniente da laringe:

- no Homem, as típicas fibras com varicosidades localizadas por baixo e no interior do epitélio continham apenas CGRP e SP (Hauser-Kronberger e tal., 1994);
- no cão, as percentagens de neurónios imunorreactivos ao CGRP (81,5%) e à SP (24,5%) eram muito superiores àquelas obtidas para outros peptídeos (Hisa e tal., 1994); um estudo comparativo com recurso às técnicas de imunocitoquímica e de traçadores neuro-anatómicos concluiu que a densidade e distribuição das fibras CGRP- e SP-IR correspondiam à densidade e padrão de distribuição dos aferentes primários marcados anatomicamente com traçador (Yoshida e tal., 2000).

Deste modo, com o objectivo de analisar, no Rato, a morfologia e o padrão de distribuição dos aferentes primários da laringe, as fibras CGRP-IR e SP-IR foram utilizadas, no presente trabalho, como marcadores da enervação sensitiva do órgão.

Apesar da distribuição das fibras CGRP- e SP-IR ser semelhante, o que indica uma distribuição sobreposta destes peptídeos, as primeiras eram mais numerosas que as segundas.

Este dado indica que deverão existir fibras contendo exclusivamente CGRP e que o CGRP seja o peptídeo mais importante do epitélio laringeo, o que está de acordo com um estudo realizado no Cão (Hisa, 1994).

No entanto, um outro estudo no Rato (Domeij e tal., 1991) mostrou uma densidade e distribuição muito semelhante das fibras CGRP- e SP-IR.

Mais uma vez, estes resultados divergentes podem resultar das diferentes estirpes e/ou das idades dos animais usados e/ou dos diferentes protocolos experimentais seguidos (ver acima).

Tal como noutras áreas periféricas do corpo, a grande concentração de fibras CGRP- e SP-IR indica que deverão conter terminações livres sensíveis a estímulos nóxicos.

De facto, ambos os peptídeos estão presentes em grande número de fibras C- e Ad-que medeiam a transmissão de informação nociceptiva da periferia para o sistema nervoso central (Millan, 1999).

No rato, a desnervação (excisão de parte do nervo vago - vagotomia) ou o tratamento com capsaicina (que destrói a grande maioria das fibras C) induzem uma grande ou mesmo completa redução do número de fibras CGRP- e SP-IR da mucosa laringea (Domeij e tal., 1991).

As mucosas da metade dorsal das cordas vocais e da porção laringea da epiglote são as áreas enervadas mais densamente, o que corrobora dados obtidos noutras espécies (revisão por Yoshida e tal., 2000).

Assim, estas zonas da laringe deverão ser as mais sensíveis a estímulos nóxicos e, por isso, as principais responsáveis pela nocicepção derivada da laringe e pela inflamação neurogénica.

CONCLUSÕES

A descoberta de terminais sensitivos ao nível da camada mucociliar permite compreender as razões pelas quais a mucosa da laringe fica mais irritável em condições de desidratação e de ausência de muco, bem como compreender melhor certas formas de laringite cuja

base etiopatogénica pode ser a da libertação dos peptídeos presentes nestas fibras promovendo a inflamação neurogénica.

Nota importante os resultados deste estudo foram publicados e validados cientificamente na revista "The Laryngoscope" de Junho de 2004, vol. 114, pags. 1074-1077.

AGRADECIMENTOS

Este estudo é financiado pelo Projecto nº POCTI/NSE/46399/2002 da Fundação de Ciência e Tecnologia (FCT).

BIBLIOGRAFIA

- Bradley R. 2000. Sensory Receptors of the Larynx. *Amer. J. Med.*, **108**: 47S-50S.
- Domeij S, Dahlqvist A, Forsgren S. 1991. Regional differences in the distribution of the nerve fibers showing substance P and calcitonine gene-related peptide-like immunoreactivity in the rat larynx. *Anat Embryol (Berl)*, **183**: 49-56.
- Domeij S, Dahlqvist A, Forsgren S. 1991. Studies on colocalization of neuropeptide Y, vasoactive intestinal peptide, catecholamine-synthesizing enzymes and acetylcholinesterase in the larynx of the rat. *Cell Tissue Res*, **263**: 495-505
- Hauser-Kronberger C, Hacker G, Albegger K, Saria A, Muss W H, Schlohmicher-Thier J, Dietze O. 1994. Autonomic and peptidergic innervation of the human larynx. *HNO.*, **42**: 89-98.
- Hisa Y, Sato F, Fukui K, Ibata Y, Mizukoshi O. 1985. Substance P nerve fibers in the canine larynx by PAP immunohistochemistry. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, **100**:128-133.
- Hisa Y, Tadaki N, Uno T, Okamura H, Taguchi J, Ibata Y. 1994. Neuropeptide participation in canine laryngeal sensory innervation. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, **103**: 767-770.
- Hisa Y, Koike S, Bamba H, Shogaki K, Uno T. 1999. Neurotransmitters and neuromodulators involved in laryngeal innervation. *Ann Otol. Rhinol. Laryngol.. Suppl.*, **178**: 3-14.
- Huang F, Zhuo H, Sinclair C, Goldstein M E, McCabe J T, Helke C J. 1994. Peripheral deafferentation alters calcitonin gene-related peptide mRNA expression in visceral sensory neurons of the nodose and petrosal ganglia. *Mol. Brain Res.*, **22**: 290-298.
- Millan, M.J. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.*, **57**: 1-164.
- Rha K S, Majima Y, Sakakura Y, Yasui Y, Nakano K, Ishihara A 1994. Distribution of substance p immunoreactive nerve fibers in the tracheal submucosal gland of cats. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, **103**: 222-226.
- Tanaka Y, Yoshida Y, Hirano M, Morimoto M, Kanaseki T. 1993. Distribution of SP- and CGRP-immunoreactivity in cat's larynx. *J. Laryngol. Otol.*, **107**: 522-526.
- Tanaka Y, Yoshida Y, Hirano M. 1995. Precise localization of VIP-, NPY-, and TH-Immunoreactivities of cat laryngeal glands. *Brain Res. Bull.*, **36**: 219-224.

- Widdicombe J. 1998. Afferent receptors in airways and cough. *Resp. Physiol.*, **114**: 5-15.
- Widdicombe J. 1986. Reflexes of the upper respiratory tract. In: Fishman AP, Cherniack NS, Widdicombe JG, Geiger SR, eds., *Handbook of Physiology*. Bethesda, MD: The American Physiological Society, pp. 363-394.
- Yamamoto Y, Atoji Y, Susuki Y. 1997. Innervation of taste buds in the canine larynx as revealed by immunohistochemistry for the various neurochemical markers. *Tissue Cell.*, **29**: 339-46.
- Yamamoto Y, Atoji Y, Susuki Y. 1998. Neurochemical markers in the nervous plexus of the canine glottis. *J. Auton. Nerv. Syst.*, **71**: 111-119.
- Yamamoto Y, Atoji Y, Susuki Y. 2000. Calbindin D28k-immunoreactive afferent nerve endings in the laryngeal mucosa. *Anat. Rec.*, **259**: 237-47.
- Yoshida Y, Tanaka Y, Hirano M, Nakashima T. 2000. Sensory Innervation of the Pharynx and Larynx. *Amer. J. Med.*, **108**: 51S-61S.