



Brazilian Journal of Otorhinolaryngology

ISSN: 1808-8694

revista@aborlccf.org.br

Associação Brasileira de  
Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-  
Facial  
Brasil

Fonseca Barbosa, Luiz Henrique; Lisboa Ramos, Hugo Valter; Rodrigues Neves, Luciano; Grigoletto De Biase, Noemi; Oshima, Celina; de Sá Pedroso, José Eduardo; de Lima Pontes, Paulo Augusto  
Detecção de receptor de ácido hialurônico em prega vocal humana por método imunohistoquímico

Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, vol. 74, núm. 2, marzo-abril, 2008, pp. 201-206

Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial

São Paulo, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=392437845007>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal  
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

## Detecção de receptor de ácido hialurônico em prega vocal humana por método imunohistoquímico

**Luiz Henrique Fonseca Barbosa<sup>1</sup>, Hugo Valter Lisboa Ramos<sup>2</sup>, Luciano Rodrigues Neves<sup>3</sup>, Noemí Grigoletto De Biase<sup>4</sup>, Celina Oshima<sup>5</sup>, José Eduardo de Sá Pedroso<sup>6</sup>, Paulo Augusto de Lima Pontes<sup>7</sup>**

## Detection of Hyaluronic Acid Receptor in Human Vocal Folds by immunohistochemistry

Palavras-chave: imunohistoquímica, laringe, prega vocal, ácido hialurônico.

Keywords: immunohistochemistry, larynx, vocal fold, hyaluronic acid.

### Resumo / Summary

O receptor do ácido Hialurônico é uma glicoproteína da membrana plasmática, sendo o principal o CD44, e está expresso em vários tipos de células onde possui a função de adesão celular. **Objetivo:** Estudar a possibilidade de empregar o método imunohistoquímico para identificar a distribuição dos receptores de ácido hialurônico ao longo da prega vocal humana. **Material e Métodos:** Foram ressecadas as pregas vocais normais de um indivíduo de 23 anos, sexo masculino, cor negra. As lâminas foram analisadas por meio de estudo histomorfométrico, comparando-se a intensidade das cores nas camadas superficial, média e profunda da lámina própria. Nas lâminas silanizadas foi utilizado método imunohistoquímico, sendo avaliadas através de microscopia óptica com aumento 40 vezes, obtendo coloração marrom onde houve a reação com receptor para ácido hialurônico. **Resultados:** Os achados imunohistoquímicos mostraram presença de receptores para ácido hialurônico no epitélio de cobertura da prega vocal tendo maior concentração na região central da prega vocal. **Conclusão:** A técnica de imunohistoquímica, utilizada para avaliar a distribuição dos receptores para ácido hialurônico na pregas vocais humanas, mostrou sua disposição em epitélio da prega vocal e predomínio no terço médio, em relação às demais regiões na prega vocal estudada.

**H**yaluronic acid receptor is a glycoprotein of the plasmatic membrane, and the CD44 is its representative, expressed in many cell types where it has the task of cell adhesion. **Aim:** the goal of the present experimental study is to investigate the possibility of using immunohistochemistry to identify the distribution of hyaluronic acid along the vocal fold. **Materials and Methods:** We resected the normal vocal folds from a normal 23 year-old male black individual. The slides were analyzed by means of a histomorphometric study, comparing the color intensity in the superficial, middle and deep layers of the lamina propria. In the silanized slides we used immunohistochemistry, and evaluated the slides under light microscopy with 40x magnification, and the color changed to brown when there was a reaction with the receptor for hyaluronic acid. **Results:** Immunohistochemical findings showed the presence of hyaluronic acid receptors in the epithelium covering the vocal fold, being more concentrated in the central region of the vocal fold. **Conclusion:** immunohistochemistry, used to assess the distribution of hyaluronic acid receptors in the central portion of the vocal fold, proved it to be present in the vocal fold epithelium and it prevailed in its middle third.

<sup>1</sup> Mestre em ciências pelo Departamento de ORL da UNIFESP-EPM, professor substituto da Disciplina de ORL da UFBA.

<sup>2</sup> Mestre em ciências pelo Departamento de ORL da UNIFESP-EPM, Doutorando do Departamento de ORL da UNIFESP-EPM.

<sup>3</sup> Mestre em Ciências pelo Departamento de ORL da UNIFESP-EPM, Doutorando do Departamento de ORL da UNIFESP-EPM.

<sup>4</sup> Doutora em Medicina pelo Departamento de ORL da UNIFESP-EPM, Professora Orientadora da Pós-Graduação do Departamento de ORL da UNIFESP-EPM.

<sup>5</sup> Doutora em Medicina pelo Departamento Patologia da UNIFESP-EPM, Professora Orientadora do Setor de Patologia Molecular do Departamento de Patologia da UNIFESP-EPM.

<sup>6</sup> Doutor em Medicina pelo Departamento de ORL da UNIFESP-EPM, Coordenador do Setor de Laringologia e Voz do Departamento de ORL da UNIFESP-EPM.

<sup>7</sup> Professor Titular do Departamento de ORL da UNIFESP, Chefe do Departamento de ORL da UNIFESP.

Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

Endereço para correspondência: Luiz Henrique Barbosa - Rua Tenente Fernando Tuy 139 ap. 204 Itaigara Salvador BA 41810-780.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBORL em 11 de janeiro de 2007. cod.3591

Artigo aceito em 28 de junho de 2007.

## INTRODUÇÃO

A fonação é a função mais recente na filogenética laríngea, utilizando a mesma estrutura anatômica da respiração e deglutição, sendo necessário um maior controle do sistema nervoso central.

A fisiologia da produção dos sons pelas pregas vocais (PPVV) mantém íntima relação com as características da lâmina própria (LP).

A estrutura histológica da prega vocal (PV) foi descrita nas seguintes camadas: a superficial, também chamada de espaço de Reinke, formada por fibras elásticas e colágenas de modo frioso em sua organização; a intermediária, formada por maior quantidade de fibras elásticas e colágenas; e a profunda da LP formada por maior quantidade fibras colágenas dispostas paralelamente ao eixo longitudinal da PV. A união das camadas intermediária e profunda da LP forma o ligamento vocal. A partir desta estrutura trilaminar da LP, desenvolveu-se a teoria do corpo-cobertura e correlacionou-se com a vibração da prega vocal de acordo com a distribuição das fibras elásticas e colágenas<sup>1</sup>.

O epitélio que recobre a mucosa da prega vocal é formado por epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado nas faces vestibular e infraglótica, sendo que na borda livre o epitélio é estratificado, não queratinizado.

A cobertura da PV (formada pelo epitélio e camada superficial da LP) vibra sobre as camadas mais profundas da LP (ligamento vocal e músculo vocal) formando a onda mucosa da prega vocal<sup>2</sup>.

A liberdade de movimentos da cobertura da prega vocal depende das condições da lâmina própria. Esta é dependente da adequada estrutura da matriz extracelular e distribuição das proteínas, refletindo na qualidade da voz.

A matriz extracelular (MEC) contém complexos macromoleculares relativamente estáveis, formados por estruturas de diferentes naturezas que são produzidas e exportadas pelas células, modulando a estrutura, biomecânica e fisiologia dos tecidos. Esta biomecânica está intimamente ligada à quantidade de tecido vibrátil<sup>3</sup>.

O Ácido Hialurônico (AH) é um glicosaminoglicano (GAG) não sulfatado de alto peso molecular sintetizado na membrana plasmática por um complexo enzimático de vários tipos celulares, representando o principal GAG dos tecidos conjuntivos e é liberado para fora da célula, à medida que é produzido<sup>4-6</sup>.

O AH na prega vocal tem função de promover uma adequada viscoelasticidade na lâmina própria para a formação da onda mucosa durante a fonação e absorção de impacto, protegendo-a de traumas causados pelo contato constante das PPVV durante a fonação e manutenção da viscosidade e elasticidade tecidual para manutenção do limiar energético e controle da freqüência fundamental<sup>7-8</sup>.

A distribuição do AH se faz presente na membrana

basal e músculo vocal, e ausente no epitélio da PV como demonstrado em estudos em laringes de coelhos com a utilização de proteína de ligação específica por meio de método histoquímico<sup>9</sup>.

O receptor do AH é uma glicoproteína da membrana plasmática da célula, sendo o principal o CD44<sup>10</sup>. Estas isoformas de receptores apresentam grande heterogeneidade em sua estrutura primária. Acredita-se que a estrutura complexa tem importância na realização das funções como: interação célula-célula; e célula-matriz extracelular<sup>11</sup>.

O CD44 está expresso em vários tipos de células onde possui a função de adesão celular, incluindo linfócitos, células mieloides, fibroblastos, retina e células gliais do Sistema Nervoso Central<sup>11</sup>.

A agregação dos vários tipos de células pode ser inibida por enzimas que degradam o AH. Estudos revelam que o receptor reconhece a seqüência de açúcar do AH, podendo, também, se ligar ao chondroitin sulfato com baixa afinidade, mas não a outro GAG<sup>10</sup>.

Mecanismo para a remoção do AH depende do aumento da concentração de receptores CD44. Esses receptores são responsáveis pela ligação do AH a superfície da célula podendo ser carregado para o interior da célula sendo degradado por enzimas lisossomais<sup>12</sup>.

Os receptores em tecido epitelial estão preferencialmente expressados em células em proliferação quando comparados com tecidos que não estavam em proliferação celular<sup>10</sup>.

A alta concentração de AH e altos níveis de CD44 tem grande relação com tumorogênese, levando o CD44 ser considerado marcador tumoral para tumores urológicos e mama principalmente<sup>11</sup>.

O estudo da concentração do AH e dos seus receptores ao longo das camadas das pregas vocais é importante para entendimento de suas funções e posterior comparação com estudos em pregas vocais alteradas.

O objetivo deste trabalho experimental é estudar a possibilidade de empregar o método imunohistoquímico para identificar a distribuição dos receptores de ácido hialurônico ao longo da prega vocal humana.

## MATERIAL E MÉTODO

O projeto de pesquisa foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP: 1298/04) e contou com o consentimento do Instituto Médico Legal. Após a aprovação pelo Comitê de Ética, foi iniciado o estudo.

Obedecendo às normas e diretrizes do IML, foram coletadas dez pregas vocais oriundas de cinco cadáveres com idade entre 20 e 40 anos, gênero masculino, sendo 3 de cor branca e 2 de cor negra, morte causada por ferimento de arma de fogo. Indivíduos submetidos à intubação traqueal, trauma cervical e mais de 12 horas de óbito foram excluídos.

As pregas vocais foram coletadas por meio de cervicotomia anterior, identificando o arcabouço laríngeo. Realizou-se a abertura da luz faríngea por incisão em região supraglótica, identificando-se a região glótica. A laringe foi isolada das estruturas vizinhas e retirada do cadáver após separação da traquéia entre o segundo e terceiro anel cartilagíneo.

A região posterior da laringe foi aberta por meio de incisão na musculatura interaritenóidea e na cartilagem cricóidea. Com a exposição das pregas vocais, o exame macroscópico foi realizado para que se excluíssem do estudo aquelas que apresentassem lesões, hematomas, hemorragias ou outros sinais de trauma. As pregas vocais que não apresentaram lesões macroscópicas foram medidas e dissecadas da cartilagem tireóidea, tendo como plano de clivagem o pericôndrio interno. As pregas vocais retiradas foram afixadas em superfície de madeira, mantendo as dimensões preservadas, com a utilização de alfinetes, a fim de se evitar a retração ou torção do tecido. Utilizou-se a musculatura como ponto de fixação, preservando-se o epitélio e LP<sup>13,14</sup>.

Para o transporte das pregas vocais, foi utilizada solução salina 0,9% dentro de frascos individualizados, evitando a desidratação durante o transporte do IML ao laboratório.

As pregas vocais que apresentaram quaisquer alterações microscópicas da mucosa foram descartadas. A análise microscópica das pregas vocais foi realizada por meio de um microscópio DF Vasconcelos 9000 com aumento de 40 vezes. Após esta análise, as pregas vocais de um indivíduo de 23 anos, de cor negra, foram consideradas normais e, aleatoriamente, a prega vocal direita foi selecionada para o estudo.

A prega vocal foi fixada em solução de formaldeído a 10%, tamponado. A desidratação do tecido ocorreu por meio de sucessivos banhos de álcool etílico absoluto. Posteriormente, foram realizados vários banhos de xilol e parafina até que a prega vocal estivesse parafinada.

Para a análise em toda a extensão da PV, a mesma foi seccionada transversalmente em nove regiões, distantes a cada 1mm. Os fragmentos estendiam-se da borda anterior da prega vocal - nomeada de região de número 1 - até o processo vocal da cartilagem aritenóidea - região de número 9. Os nove fragmentos foram incluídos em diferentes blocos de parafina. Cada bloco recebeu como identificador o número da posição em que se encontrava na prega vocal.

De cada segmento da prega vocal foram retirados quatro cortes com 4 micrômetros de espessura para confecção das lâminas para estudo histológico e imunohistoquímico. Três cortes de cada segmento foram utilizados para a realização das colorações Hematoxilina-Eosina (HE) Tricromio de Masson e Alcian Blue e o quarto corte foi

utilizado para a realização do estudo imunohistoquímico com lâminas previamente silanizadas. As lâminas com HE e Tricrômio de Manson foram utilizadas para orientação no estudo histológico. Foi utilizado anticorpo polyclonal contra proteína de ligação do ácido Hialurônico obtido a partir de cartilagem nasal bovina liofinizado e fabricado pelo laboratório USBiological.

As lâminas foram analisadas por meio de estudo histomorfométrico, comparando-se a intensidade das cores nas camadas superficial, média e profunda da lâmina própria.

Para a determinação dos campos de estudo, na camada superficial a região escolhida encontrava-se justaposta à membrana basal. Quanto às camadas profunda e intermediária, os campos definidos foram adjacentes ao plano muscular e na porção média da LP, respectivamente.

As lâminas silanizadas onde foi utilizado método imunohistoquímico foram observadas através de microscopia óptica com aumento 40 X, observando coloração marrom onde houve a reação com receptor para AH.

As imagens das lâminas foram digitalizadas com o emprego de câmera digital (Sony Hyper HAD) acoplada a microscópio óptico (Laboval 4) utilizando-se aumento de 400 vezes. A imagem congelada foi processada pelo software DIRACOM3, atualmente remodelado e comercializado com o nome de Imagelab 2000<sup>13,14</sup>.

Os resultados foram analisados descritivamente.

## RESULTADOS

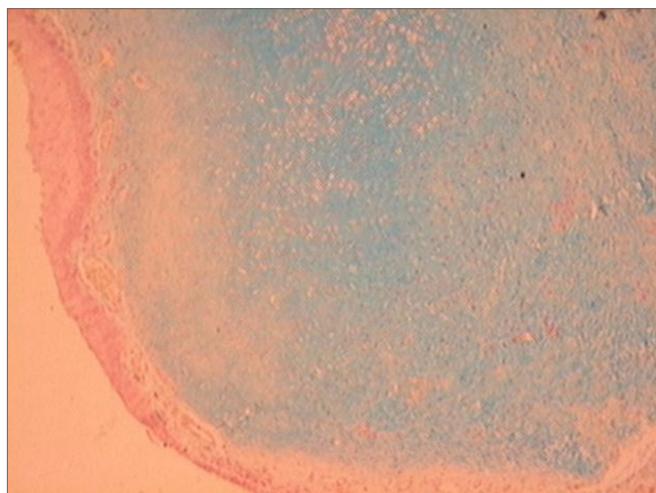
A Tabela 1 mostra a quantidade de ácido hialurônico encontrado na LP da prega vocal medida pela coloração Alcian Blue. Os valores encontrados foram distribuídos de acordo com a região da prega vocal e com a camada da LP estudada. Esses valores correspondem à porcentagem da área das cores selecionadas pelo software Imagelab 2000 em relação à área da imagem original.

Analizando os valores obtidos na coloração Alcian Blue, observou-se que as camadas intermediária e profunda da prega vocal apresentam valores maiores aos da camada superficial e que esta distribuição ocorre ao longo de toda a prega vocal, apresentando valores menores na porção central da prega vocal em relação às regiões anterior e posterior onde se localizam as máculas flavas (Figuras 1, 2, 3).

Os achados imunohistoquímicos apresentaram presença de receptores para ácido hialurônico no epitélio de cobertura da prega vocal tendo maior concentração na região central da prega vocal (áreas 4, 5, 6) com algumas células em outras regiões do epitélio e ausência de receptores nas camadas da lâmina própria da prega vocal (Figuras 4, 5, 6).

**Tabela 1.** Porcentagem de cor azul nas lâminas coradas pela técnica Alcian Blue nas camadas superficial, média e profunda da prega vocal.

Áreas	Camada Superficial	Camada intermediária	Camada Profunda
1	2,4	23,6	21,7
2	3,1	23,0	33,7
3	1,4	12,0	9,1
4	1,1	9,1	8,9
5	2,0	8,6	9,4
6	1,3	10,0	9,6
7	1,0	10,4	9,3
8	2,9	20,3	18,8
9	1,4	23,5	23,0



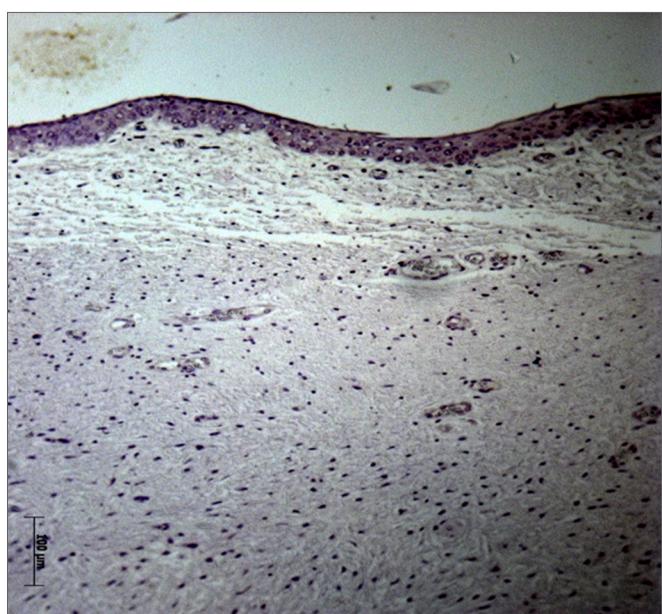
**Figura 1.** Mácula flava anterior - Lâmina com coloração Alcian Blue



**Figura 2.** ÁREA intermediária de prega vocal - Lâmina corada com Alcian Blue.



**Figura 3.** Mácula Flava posterior - Lâmina corada com Alcian Blue.



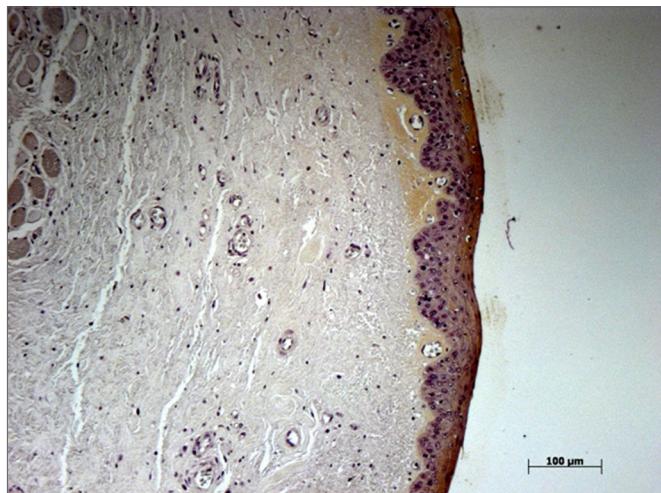
**Figura 4.** ÁREA de Mácula Flava Posterior - Lâmina com método imuno-histoquímico mostrando ausência de células do epitélio coradas em marrom.

## DISCUSSÃO

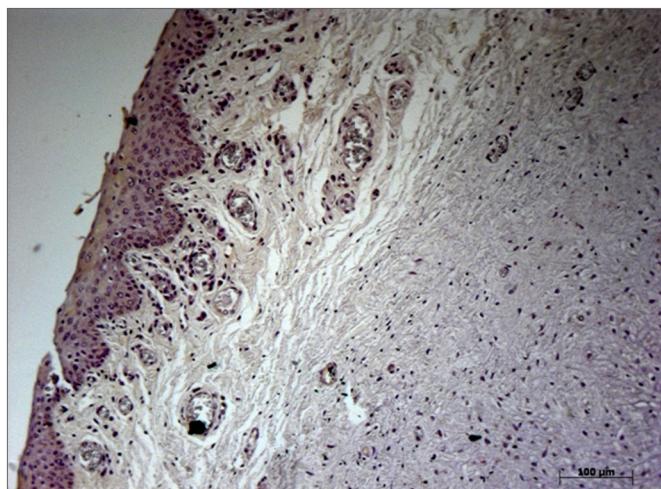
As pregas vocais são complexas, de estrutura trilaminar constituída de vários tipos de tecidos como epitélio, tecido conectivo, músculo estriado, nervos e vasos sanguíneos<sup>15</sup>.

A importância da lâmina própria na produção da voz é observada clinicamente nas desordens de sua vibração encontradas em alterações anatômicas e lesões secundárias, levando a disfonia<sup>16</sup>.

O AH e outras macromoléculas encontradas na matriz extracelular da lâmina própria têm importância me-



**Figura 5.** Região intermediária de prega vocal - Lâmina com método imunohistoquímico mostrando presença de inúmeras células do epitélio coradas em marrom.



**Figura 6.** Área de mácula flava anterior - Lâmina com método imunohistoquímico mostrando poucas células do epitélio coradas em marrom.

cânica e biológica nas propriedades das pregas vocais.

Uma das funções do AH é promover uma menor viscosidade dinâmica, garantindo adequada produção de sons em freqüências altas com menor limiar energético<sup>8</sup>.

Para melhor entender a fisiologia do AH na lâmina própria é que se faz necessário o maior conhecimento da distribuição e concentração ao longo da prega vocal. Estudos foram realizados, e em sua maioria analisando apenas o terço médio da porção membranosa da PV.

Estudos em prega vocal avaliando concentração e distribuição do AH, utilizando como marcador uma sonda de ligação ao AH isolada de cartilagem nasal bovina observaram uma maior concentração do AH nas máculas flava, anterior e posterior, da prega vocal e distribuição na camada intermediária da PV e ao redor das fibras musculares e cápsula das glândulas<sup>9,17</sup>.

As máculas flava são formadas por uma massa de fibras elásticas e constituiriam uma prolongação da camada intermediária da lâmina própria da PV. Com a função de proteger o ligamento vocal de possíveis lesões mecânicas, essas estruturas funcionariam como um amortecedor de impactos resultantes da vibração das pregas vocais. Posteriormente mostrou-se que as máculas flava também eram compostas por fibras colágenas, fibroblastos e outras substâncias extracelulares e desempenhariam importante papel no crescimento e desenvolvimento da prega vocal, sendo responsáveis pela formação das fibras colágenas, elásticas e pela formação dos demais componentes da matriz extracelular, observando funções do AH, porém não o identificando<sup>15</sup>.

A presença de AH ao redor das fibras do músculo vocal é justificada porque leva a lubrificação facilitando movimentos rápidos. Esses movimentos são necessários para que a laringe cumpra sua função de proteção da via aérea inferior durante a deglutição<sup>9</sup>.

O receptor de ácido hialurônico é membro de um grupo de proteínas da membrana plasmática que mantém a interação entre a superfície da célula e componentes da matriz extracelular. Outros membros desse grupo incluem receptores para fibronectina, colágeno, laminin e heparan sulfato. A combinação dos efeitos de cada componente é que origina a propriedade adesiva da célula<sup>10</sup>.

Há evidências da expressão dos receptores do AH em células onde há proliferação celular, como nas criptas de Lieberkühn encontradas na parede do cólon, e em grande variedade de epitélio estratificado como língua, esôfago, epiderme de hamster. Em outros tipos epiteliais como células mesoteliais da córnea e estomago não foram encontrados receptores para AH<sup>10</sup>.

Essas evidências foram apresentadas após estudos com células 3T3 que apresentam crescimento inibido por contato devido à alta densidade das células, onde observou grande expressão do receptor no grupo que apresentava o crescimento e menor expressão no grupo sem crescimento<sup>10</sup>.

A relação entre a expressão de CD44 e a ausência de AH na formação do folículo piloso sugere, porém, não prova que a expressão de CD44 faz com que células mesenquimais e macrófagos realizem degradação do AH<sup>12</sup>.

Em nosso estudo não apresentamos reações específicas para ácido hialurônico, porém, o estudo histológico com Alcian Blue mostrou-se semelhante ao encontrado pelos realizados com uso de técnica específica para detecção do GAG e os achados com a imunohistoquímica para receptor de AH foi compatível aos estudos feitos com técnica semelhante, apesar de termos estudado apenas uma prega vocal.<sup>9-12,17</sup>

Pensamos que a maior concentração de receptor de AH na região central da PV se dá pela maior proliferação celular do local devido ao maior contato encontrado entre as pregas vocais.

A concentração de AH e seu receptor inversamente proporcional ao longo da PV também está de acordo com estudos relatados, pois na região onde é encontrada a mácula flava há uma maior concentração de AH que tem a função de coxim para absorção de impacto utilizando a função hidrofílica do AH, por isso há menor concentração dos receptores, pois a ausência destes leva a maior penetração de componentes para a lâmina própria das pregas vocais.

Os estudos da fisiologia e dos constituintes da lâmina própria das pregas vocais são de grande importância para o tratamento das variações apresentadas pelas alterações estruturais mínimas que apenas o tratamento cirúrgico não é capaz de corrigir, pois a desorganização das estruturas amorfas da LP ainda permanece mantendo a alteração da vibração da onda mucosa.

Por isso, o entendimento da composição e da funcionalidade da matriz extracelular nas diferentes camadas da prega vocal faz-se necessário para a elaboração de um tratamento, no futuro, definitivo.

## CONCLUSÕES

A técnica de imunohistoquímica é adequada para avaliar a distribuição dos receptores para Ácido Hialurônico na pregas vocais humanas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hirano M. Phonosurgery: basic and clinical investigations. *Otolgia Fukuoka* 1975;21:239-45.
2. Hirano M, Karita Y, Ohmaru K, Kurita S. Structure and mechanical properties of vocal fold. *Speech Lang* 1982;7:271-97.
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 EH, Pawlak A, Gray SD. The intermediate layer: a morphologic study of elastin and hyaluronic acid constituents of normal human vocal folds. *J Voice* 1997;11(1):59-66.
5. Ward PD, Thibault SL, Gray SD. Hyaluronic acid: its role in voice. *J Voice* 2002;16(3):303-9.
6. Butler JE, Hammond TH, Gray SD. Gender-related differences of hyaluronic acid distribution in the human vocal fold. *Laryngoscope* 2001;111(5):907-11.
7. Hammond TH, Zhou R, Hammond EH, Pawlak A, Gray SD. The intermediate layer: a morphologic study of the elastin and hyaluronic acid constituents of normal human vocal folds. *J Voice* 1997;11:59-66.
8. Chan RW, Gray SD, Titze IR. The importance of hyaluronic acid in vocal fold biomechanics. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;124(6):607-14.
9. Hallen L, Johansson C, Laurent C, Dahlqvist A. Hyaluronan localization in the rabbit larynx. *Anat Rec* 1996;246(4):441-5.
10. Alho AM, Underhill CB. The Hyaluronate receptor is Preferentially expressed on Proliferating Epithelial Cells. *J Cell Biol* 1989;108:1557-65.
11. Iida N, Bourguignon LYW. Coexpression Variant (v10/ex14) and CD44 in Human Mammary Epithelial Cells Promotes Tumorigenesis. *J Cell Physiol* 1997;171:152-60.
12. Underhill CB. Hyaluronan is Inversely Correlated with the Expression of CD44 in the Dermal Condensation of the Embryonic Hair Follicle. *J Invest Dermatol* 1993;101(6):820-6.
13. Neves IR. Técnica imunohistoquímica no estudo da distribuição e quantificação do colágeno na lâmina própria da prega vocal. Tese (Mestrado)- Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e PESCOÇO. São Paulo, 2004.
14. Ramos HVL, Neves LR, Barbosa LHF, Biase NG, Oshima CTS, Simões MJ, Pontes, PAL. Imunohistoquímica como método de estudo das fibras elásticas em prega vocal humana. *Rev Bras Otorrinolaringol São Paulo* 2005;71(4):486-91.
15. Hirano M. Structure of the vocal fold in normal and disease states anatomical and physical studies. *ASHA Rep* 1981;11:11-30.
16. Pontes P, Behlau M, Gonçalves MI. Alterações estruturais mínimas da laringe: considerações básicas. *Acta AWHO* 1994;13(1):2-6.
17. Lebl MA. Estudo da concentração e disposição do ácido hialurônico em pregas vocais humanas. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e PESCOÇO. São Paulo; 2004.