

Estudo comparativo histológico na prega vocal após incisão com instrumental a frio e com laser de CO₂ em modelo animal

Comparative histology study of the vocal folds after incision with cold instruments and CO₂ laser in an animal model

Fernando C. C. Santos¹, Marcos Grellet²,
Aguilar R. Junior³, Maria C. Jamur⁴,
José A. Pinto⁵, Denilson S. Fomin⁶

Palavras-chave: Microcirurgia de laringe,
laser de CO₂, colágeno.
Key words: larynx microsurgery,
CO₂ laser, collagen.

Resumo / Summary

Dentre os vários tipos de laser usados em Medicina, o laser de CO₂ é o mais usado na Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço. As vantagens de seu uso são a diminuição do sangramento, a diminuição do edema no pós-operatório e a facilidade de acesso ao campo operatório, entre outras. Desde os trabalhos de Jako e Strong em 1972^{1,2}, quando o laser de CO₂ passou a ser usado no tratamento de papilomatose laríngea e de lesões malignas glóticas iniciais, suas indicações têm aumentado, principalmente em lesões benignas, a partir da alta tecnologia desenvolvida dos últimos anos como, por exemplo, a diminuição do microspot e o uso do superpulso, reduzindo consequentemente seu efeito térmico sobre os tecidos. Métodos: Neste trabalho foram realizadas incisões com instrumental a frio e com laser de CO₂ 1 watt de modo contínuo e superpulso, em pregas vocais caninas e observado, através de cortes histológicos corados pelo método de Sirius Red, a quantidade de colágeno depositada sobre as mesmas. Resultados: A quantidade de colágeno das pregas vocais foi maior do que no grupo controle, e estatisticamente maior no grupo de animais submetidos a procedimentos com instrumental a frio do que com laser de CO₂. Não houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo submetido a incisões com instrumentos a frio. Conclusão: A microcirurgia de laringe com o laser de CO₂, quando este é usado em baixa potência, com pequeno "microspot" e com superpulso, é um método seguro em relação à deposição de colágeno, quando comparado com instrumentos com lâmina a frio, obedecendo os princípios da fonomicrocirurgia.

Among the several types of lasers employed in medicine today, the CO₂ is the most widely used in otorhinolaryngology and head and neck surgeries. The advantages of its use are: the reduction in bleeding, reduction in post-operative edema and the easy access to the operation site, among others. Ever since Jako and Strong's works in 1972^{1,2}, when CO₂ was first applied in the treatment of papillomatosis and early glottic malign lesions, its indications have risen, most especially in benign lesions, due to new technology developed over the last years as, for example, the reduction of microspot and the super-pulse, reducing the thermal effects on the tissues. Methods: In this work, incisions with cold steel instruments and 1 watt continuous mode and super-pulse CO₂ laser were conducted on canine vocal folds. The amount of collagen deposited over the vocal folds was observed through histological exams using the Sirius Red method. Results: The amount of collagen on the vocal folds was greater than the control group and statistically greater in the group of animals submitted to surgical procedures using cold instruments than procedures involving CO₂. There was no statistical difference between the control group and the group submitted to incisions with cold steel instruments. Conclusions: The larynx surgery with CO₂ laser, when employed in low potency, with small microspot and super-pulse, is a safe method in relation to the collagen deposit when compared with cold blade instruments.

¹ Preceptor da Residência Médica do Núcleo de Otorrinolaringologia de São Paulo.

² Professor Adjunto da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

³ Médico Residente do Núcleo de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço de São Paulo.

⁴ Prof. Dra. do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP.

⁵ Diretor do Núcleo de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço de São Paulo (NOSP).

⁶ Professor Doutor da Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo na Área de Concentração Otorrino.

Endereço para Correspondência: José A. Pinto – Alameda dos Nhambiquaras, 159
Moema 04090-010 São Paulo SP.

Tel/Fax (0xx11) 5573-1970 – E-mail: japorl@cepa.com.br

Trabalho realizado em conjunto pelo Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e pelo Núcleo de otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço de São Paulo – Hospital São Camilo-SP.

Artigo recebido em 01 de agosto de 2003. Artigo aceito em 04 de setembro de 2003.

INTRODUÇÃO

O otorrinolaringologista que realiza microcirurgia de laringe usando o laser de CO₂, além de ter um conhecimento detalhado da anatomia, da histologia e da fisiologia da laringe humana, deve saber os princípios físicos e biológicos da tecnologia do laser e da sua interação com os tecidos.

O laser é um fluxo luminoso de alta intensidade de energia, que se caracteriza pelo paralelismo de suas ondas (luz coerente) e pela sua distribuição espectral estreita com o mesmo comprimento de onda (monocromatismo). Através de lentes, prismas e espelhos, esta luz pode ser concentrada e projetada com alta concentração de energia em áreas pequenas e precisas.^{3,4}

O laser de CO₂ é uma mistura de gases de CO₂, N₂ e He cujo comprimento de onda é de 10,6 micra na faixa espectral infravermelha. A energia calórica produzida pelo raio é quase totalmente absorvida pelos tecidos biológicos, produzindo destruição tecidual pela rápida vaporização de água dos tecidos e pela desnaturação térmica de suas proteínas tissulares. O primeiro fator é responsável pela ablação dos tecidos, enquanto a desnaturação protéica em pequeno número de células circundantes oblitera pequenos vasos e coagula instantaneamente o sangue em vasos de até 0,5 mm de diâmetro.^{5,6,7}

As vantagens da interação do laser de CO₂ com os tecidos orgânicos em relação aos métodos convencionais cirúrgicos são: diminuição do sangramento decorrente da fotocoagulação de vasos com calibre igual ou inferior a meio milímetro, diminuição do edema pós-operatório que ocorre devido à pequena manipulação da área cirúrgica, facilidade de acesso ao campo operatório, precisão com a possibilidade de dirigir o laser diretamente a área desejada, diminuição do tempo cirúrgico e rápida recuperação.⁷ Além disto, a cicatrização após o uso do laser de CO₂ é normal ou com o mínimo de retardo, havendo epitelização completa em três semanas.⁸

O uso do "microspot", reduzindo o diâmetro do raio laser na área de impacto associado ao superpulso, no qual a energia é aplicada em um tempo mais curto, permite que o raio atue como um bisturi delicado, realizando incisões precisas, com menos efeitos térmicos sobre o ligamento vocal, sem carbonização, com redução considerável do edema e da proliferação fibroblástica.^{10,11}

A energia térmica excessiva transmitida às pregas vocais pode resultar em fibrose e aderência do epitélio ao ligamento vocal, criando rigidez e alteração da onda mucosa com prejuízo da qualidade vocal. Isso ocorria com as antigas gerações de lasers, que utilizavam "spots" maiores que 800 micra e técnicas de vaporização de lesões benignas.

As idéias da fonomicrocirurgia criaram o conceito de que a transmissão inadvertida de energia térmica do laser de CO₂ sobre a camada superficial da lâmina própria resulta em fibrose e aderência do epitélio da prega vocal sobre o

ligamento vocal. A mucosa da prega vocal aderente cria um sistema vocal de tensão e compromete a produção da voz.¹¹⁻¹⁴

Em razão dos seus efeitos térmicos sobre a prega vocal o uso do laser para a terapia cirúrgica de afecções benignas das pregas vocais é ainda controverso.¹³⁻¹⁶ O uso do laser de CO₂ para tratamento de lesões benignas de pregas vocais depende de casos devidamente selecionados e da experiência do cirurgião com a moderna tecnologia.¹⁷⁻²⁰

O laser de CO₂ com o microspot é efetivo e seguro, quando usado apropriadamente em níveis intermitentes baixos, para remover lesões laríngeas benignas. Instrumentos microlaríngeos refinados podem prover resultados equivalentes quando usados em lesões pedunculadas pequenas, tais como nódulos. A técnica com laser é particularmente indicada para tratar pacientes que apresentam pólipos vasculares e lesões como os granulomas. Além disso, o laser é extremamente útil para incisão e evacuação de pregas vocais polipóides com estroma mixóide.¹⁶

A vantagem do laser em relação à hemostasia permite que seja realizada a dissecação dos microflaps mais facilmente. Os instrumentos a frio são geralmente melhor utilizados para a ressecção de lesões superficiais e pequenas. O laser de CO₂ facilita a ressecção de lesões largas e vasculares, como também em regiões supraglóticas.¹⁸

Através da análise histológica e quantitativa do colágeno de pregas vocais caninas de um grupo controle e de um grupo que foi submetido a incisões com instrumentos a frio e com laser de CO₂, este estudo teve como objetivos: analisar a quantidade de colágeno, comparar quantitativamente e estatisticamente o colágeno de pregas vocais caninas dos grupos que foram submetidos a cirurgia com instrumentos a frio e com laser de CO₂ e evidenciar se existe diferença estatística entre o grupo controle e os grupos submetidos a cirurgia com instrumentos a frio e com laser de CO₂.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas neste trabalho as pregas vocais de 17 cães, que variavam o seu peso de 6 a 13 quilogramas. Três cães faziam parte de um grupo controle e em 14 cães foram realizados os procedimentos cirúrgicos, que obedeciam a um mesmo padrão. Todos os 14 cães foram submetidos a anestesia geral para a realização dos procedimentos. Os cães recebiam um pré-anestésico de Ketalar® (ketamina) intramuscular 50 gramas por Kilograma de peso.

Os 14 cães foram anestesiados com Thionembotal® endovenoso (tiopental sódico) 40 mg/Kg/peso e, com laringoscópio de Kleinsasser, foi realizada a laringoscopia de suspensão. As pregas vocais caninas foram visibilizadas através de um microscópio óptico (DF Vasconcelos®) binocular reta com lente de 400 mm.

No terço médio da prega vocal esquerda destes 14 cães foi realizada uma incisão de cerca de 0,5 centímetros com instrumento a frio do tipo bisturi. Já na prega vocal direita foi realizada uma incisão de cerca de 0,5 centímetros com Laser de CO₂ (Sharplan® – Israel) 1 watt de potência contínuo no modo focado com Acuspot® de 250 micra.

Após 30 dias da cirurgia, os cães foram sacrificados com injeção endovenosa de Thionembatal® e 10 ml de cloreto de potássio 19,1%, e laringectomizados. As laringes caninas removidas foram colocadas em formalina 10%.

As pregas vocais caninas dos 17 cães, depois de colocadas em formalina 10%, foram lavadas em água e desidratadas em soluções com concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e colocados em parafina.

Foram realizados cortes de 5 micrômetros de espessura, corados com solução de 0,1 g de Sirius Red em 100 ml de solução de ácido pícrico, e expostos em lâminas de vidro para a realização da histoquímica.

As lâminas foram medidas através da área total de tecido obtido e através da área birrefringente, o qual corresponde à quantidade de colágeno.

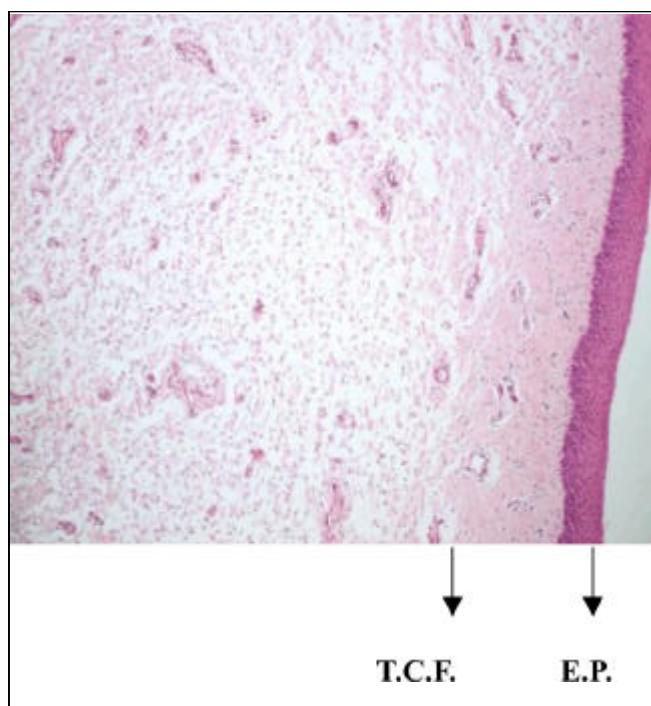


Figura 1- Corte histológico da prega Vocal Canina - (Hematoxilina – Eosina)

A prega vocal é revestida por um epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado (**E.P.**). Abaixo do epitélio observa-se a lâmina própria constituída por um tecido conjuntivo frouxo contendo vasos sanguíneos e tecido linfático difuso (**T.C.F.**).

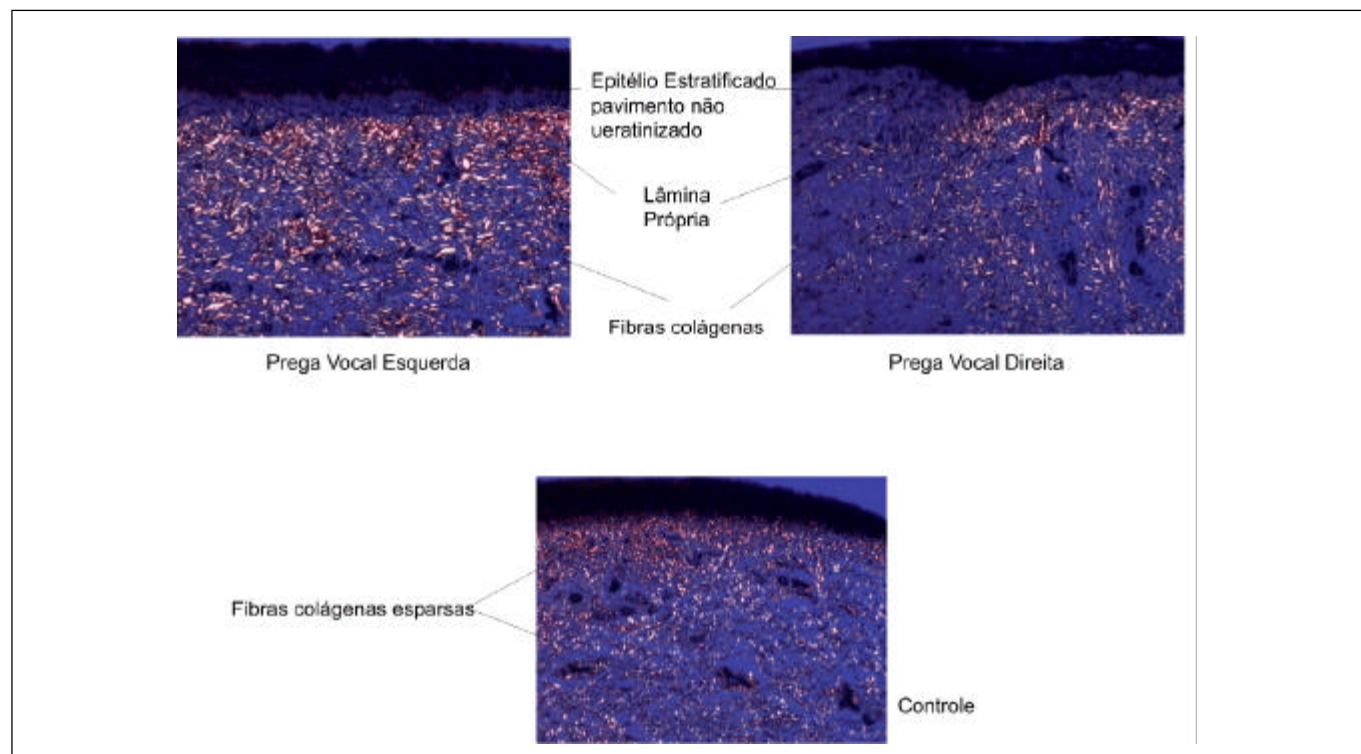


Figura 2. Comparação entre as Pregas Vocais Direita e Esquerda de um dos 14 Cães do Grupo Submetido à Cirurgia com uma Prega Vocal de um Cão do Grupo Controle.

RESULTADOS

Nos 14 cães submetidos a procedimentos com laser de CO₂ e com bisturi a lâmina a frio foi quantificado o colágeno e analisado o seu percentual. Nos 3 cães controle também foi analisada a quantidade de colágeno e o percentual tanto na prega vocal direita quanto na esquerda. Em todas as análises, a área total verificada pelo patologista foi constante, de 12,55010 micrômetros quadrados.

Observou-se uma menor quantidade de colágeno nas pregas vocais direitas (submetidas a incisões com laser de CO₂), em relação às pregas vocais esquerdas (submetidas a incisão com bisturi). (Figura 2)

No terço médio das pregas vocais dos cães submetidos a incisões com laser de CO₂, observou-se uma área de colágeno que variou de 82168,02 a 20092 micrômetros quadrados e um percentual de colágeno que variou de 6,54 a 16,007. A média obtida de percentual de colágeno, nestas

pregas, foi de 9,98. (Tabela 1)

No terço médio das pregas vocais dos cães submetidos a incisões com bisturi observou-se uma área de colágeno que variou 96344,01 a 252809,20 micrômetros quadrados e um percentual de colágeno que variou de 7,67 a 20,14. A média do percentual de colágeno destas pregas foi de 13,48. (Tabela 2).

A área de colágeno na prega vocal direita dos animais do grupo controle variou de 43322,95 a 296363,10 micrômetros quadrados, e o percentual de colágeno variou de 3,45 a 23,61. A média do percentual de colágeno destas pregas vocais foi de 8,56. (Tabela 3).

A área de colágeno da prega vocal esquerda dos animais do grupo controle variou de 36957,53 a 164978,60 micrômetros quadrados e um percentual de colágeno que variou de 2,94 a 13,1456. A média do percentual de colágeno das pregas vocais esquerdas do grupo controle foi de 8,08. (Tabela 3)

TABELA 1 – Área e quantidade percentual de colágeno de cães submetidos a incisões com Laser de CO₂ e percentuais (prega vocal direita)

Animais	Códigos	Área De Colágeno em m ²	Porcentual De Colágeno
01	01D	82168,02	6,547200421
02	55 D	86184,05	6,86
03	98 D	146022,90	11,63
04	122 D	103262,20	8,22
05	193 D	200902,00	16,00
06	513 D	144697,60	11,52
07	516 D	168753,70	13,44
08	105 D	126985,20	10,11
09	148 D	115232,23	9,18
10	53 D	105251,10	8,38
11	77 D	143581,30	11,44
12	505 D	96134,63	7,66
13	128 D	115229,30	9,18
14	48 D	119151,20	9,49
MÉDIA DOS ANIMAIS			9,98

TABELA 2. Área e quantidade percentual de colágeno de cães submetidos a incisões com bisturi a lâmina a frio (prega vocal esquerda)

Animais	Códigos	Área De Colágeno em m ²	Porcentual De Colágeno
01	01E	111254,10	8,86479789
02	55 E	96344,61	7,676800185
03	98 E	189335,80	15,08
04	122 E	107097,50	8,53
05	193 E	229425,90	18,28
06	513 E	252809,20	20,14
07	516 E	192799,70	15,36
08	105 E	186671,30	14,87
09	148 E	214471,20	17,08
10	53 E	185471,30	14,77
11	77 E	161584,30	12,87
12	505 E	171258,32	13,64
13	128 E	120365,21	9,59
14	48 E	149521,39	11,91
MÉDIA DOS ANIMAIS			13,47

TABELA 3 - Área e quantidade percentual de colágeno pregas vocais dos cães do grupo controle.

Animais	Códigos	Área de colágeno em μ^2 PVD	Porcentual de colágeno PVD	Área de colágeno em μ^2 PVE	Porcentual e colágeno PVE
1	Lâmina 1	296363,10	23,610	53202,38	4,23
	Lâmina 2	43322,95	3,450	118452,90	9,43
2	Lâmina 1	59035,67	4,700	155842,10	12,41
	Lâmina 2	94567,51	7,530	164978,60	13,14
	Lâmina 3	143924,50	11,460	129838,30	10,34
3	Lâmina 1	87720,18	6,98	36957,53	2,94
	Lâmina 2	49818,88	3,96	44256,67	3,52
	Lâmina 3	92830,58	7,39	116053,30	9,24
	Lâmina 4	100069,50	7,97	93975,15	7,48
MÉDIA		107517,00	8,56	101506,30	8,08

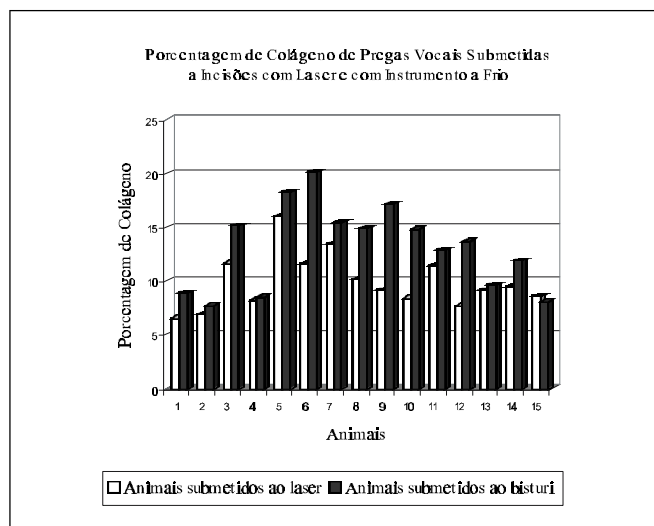


Gráfico 1. Porcentagem de colágeno de pregas vocais submetidas a incisão com instrumentos a frio e com laser de CO₂ nos 14 cães submetidos aos procedimentos. O cão 15 representa a média do percentual de colágeno dos 3 cães que não realizaram nenhum procedimento.

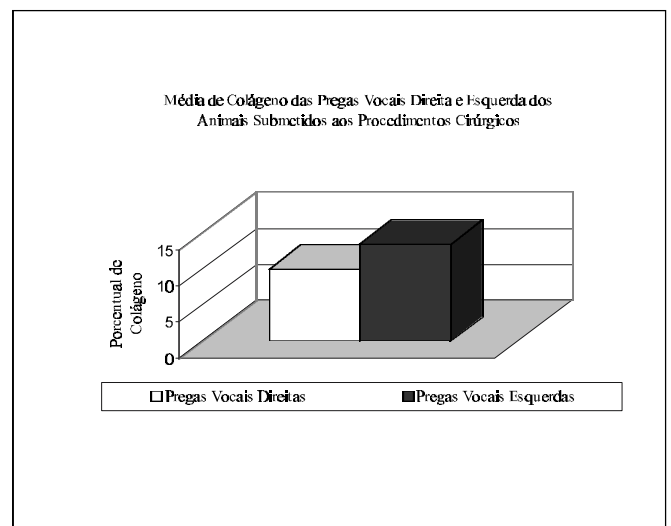


Gráfico 2. Média do colágeno das pregas vocais direitas submetidas a incisões com laser de CO₂, e das pregas vocais esquerdas submetidas a incisões com bisturi com lâmina a frio.

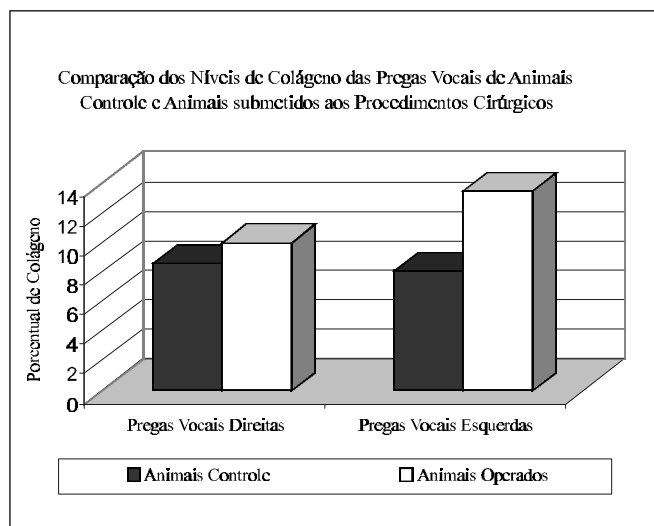


Gráfico 3. Média de colágeno entre as cordas vocais direitas dos animais controle e das cordas vocais esquerdas submetidas a cirurgia

Análise Estatística dos Resultados

Para verificarmos se existe diferença entre os resultados obtidos na prega vocal direita e na prega vocal esquerda, ou seja, se o percentual de colágeno na prega vocal esquerda é significativamente maior do que o percentual de colágeno na prega vocal direita foi aplicado o teste para a diferença entre as duas médias (teste t).

Foi encontrado $t = 2,713$, que comparado aos valores da Tabela ($t = 1,706$ para $p = 0,05$ e $t = 2,479$ para $p = 0,01$) permite-nos concluir que o percentual de colágeno é significativamente maior tanto ao nível 0,05 como ao nível 0,01 no grupo submetido a incisão com instrumentos a frio.

Analisando os resultados separadamente, isto é, as pregas vocais submetidas ao laser de CO₂ e as pregas vocais do grupo controle, pode-se chegar aos seguintes resultados.

Aplicando o teste para diferenças entre as médias, encontramos $t = 0,64$, que comparado aos valores da Tabela ($1,721$ para $p = 0,05$ e $2,518$ para $p = 0,01$) leva-nos a

Tabela 4. Animais do grupo experimental – Percentuais de Colágeno

Resultados	Prega Vocal Direita	Prega Vocal Esquerda
Média	9,98	13,48
Desvio Padrão	2,63	3,80

Tabela 5. Resultado estatístico da média de colágeno e do desvio padrão do grupo submetido a cirurgia com laser de CO₂ e do grupo controle de pregas vocais direitas.

Resultados	Grupo Experimental	Grupo Controle
Média	9,98	8,59
Desvio Padrão	2,63	6,15

Tabela 6. Resultado estatístico da média de colágeno e do desvio padrão do grupo de animais submetidos a incisões com bisturi com lâmina a frio e do grupo controle.

Resultados	Grupo Experimental	Grupo Controle
Média	13,48	8,09
Desvio Padrão	3,80	3,79

concluir que não há diferença significativa entre o percentual de colágeno na prega vocal dos animais do grupo experimental e dos animais do grupo controle.

No entanto, observando os resultados estatísticos dos cães submetidos a incisões com lâmina a frio e dos cães do grupo controle, chegamos aos resultados da Tabela 6.

O teste t para diferença entre as médias forneceu $t = 3,287$, que comparado aos valores da Tabela ($1,721$ para $p = 0,05$ e $2,518$ para $p = 0,01$) mostra-nos que há uma diferença significativa entre os percentuais de colágeno na prega vocal esquerda dos animais do grupo experimental e dos animais do grupo controle. O percentual de colágeno da prega vocal esquerda dos animais do grupo experimental é significativamente maior que o percentual de colágeno da prega vocal esquerda dos animais do grupo controle.

DISCUSSÃO

Sabe-se que o colágeno está presente, fundamentalmente, na camada profunda da lâmina própria e aumenta em quantidade conforme aprofundamos em direção ao ligamento e ao músculo vocal.¹² O espaço de Reinke apresenta apenas pequena quantidade de fibras colágenas. A quantidade de fibras colágenas com função de promover resistência à tensão tecidual é fundamental na observação da cicatrização das pregas vocais após procedimentos cirúrgicos.

A importância deste trabalho reside justamente na quantificação de colágeno, pois quanto menor a vibração das pregas vocais e maior a quantidade destas fibras, maior será a resistência e, por conseguinte, maior o prejuízo da produção da voz. O método de Picrosirius, juntamente com

a microscopia de polarização, demonstra com mais nitidez as fibras colágenas.²¹⁻²⁵

No trabalho observou-se que a quantidade de colágeno das pregas vocais submetidas aos diferentes tipos de cirurgia, tanto com laser de CO₂ quanto com bisturi com lâmina a frio, apresentava diferença significativamente estatística, como observado nas Tabelas 1 e 2. A presença de colágeno foi significativamente maior nas pregas vocais submetidas a incisões com bisturi com lâmina a frio do que com laser de CO₂, o que permite concluir que o impacto causado na produção da voz é menor em pacientes submetidos a cirurgia com laser quando utilizados baixa potência e um microspot pequeno.

Segundo alguns autores, o laser de CO₂, associado a técnicas microcirúrgicas é eficiente por realizar uma hemostasia superior às técnicas com instrumento a frio e realizar a dissecação de microflaps mais facilmente.¹⁶ Outros autores mostram que há melhora da função vocal em pacientes submetidos às técnicas com bisturi a frio e com laser de CO₂.¹⁷

Benninger¹⁹, em estudo clínico, realizou a comparação entre laser de CO₂ e bisturi a frio, em lesões benignas na laringe, e conclui que não há diferença clínica pós-operatória entre as técnicas supracitadas quando usadas para microdissecação de nódulos, pólipos, e cistos de retenção mucosa de pregas vocais.

As idéias de Ishiki¹¹ sobre os efeitos da energia térmica com laser de CO₂, causando aderência da mucosa da prega vocal, aumentando a tensão, com comprometimento vocal, pode ser evitada usando a moderna tecnologia com "microspot" de 250 micra, baixa potência e superpulso.^{9,10}

Isso permite um aumento das indicações para a realização de cirurgias de lesões benignas de pregas vocais com laser de CO₂.^{16,17,19,20}

CONCLUSÃO

O laser de CO₂ é o laser mais utilizado em cirurgias de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço. As novas tecnologias do laser, como a diminuição do "microspot" e o uso de superpulso, têm aumentado as indicações de seu uso para serem usadas também em lesões benignas de pregas vocais, respeitando as técnicas microcirúrgicas.

Este trabalho pioneiro, mostrou que a quantidade de colágeno das pregas vocais submetidas a procedimentos cirúrgicos, foi maior do que no grupo controle, a quantidade de colágeno foi estatisticamente maior no grupo de animais submetidos a instrumentos com lâmina a frio do que com laser de CO₂, e não houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo submetido a incisões com laser de CO₂.

Portanto, o laser de CO₂ é um método terapêutico seguro e eficaz, quando se utiliza a moderna tecnologia e os princípios fonomicrocirúrgicos, sem causar um aumento de tensão nas pregas vocais, através da observação da quantidade de colágeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jako GJ & Strong MS. Laser surgery in the larynx: early clinical experience with continuous CO₂ laser. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1972; 81: 791-8.
2. Strong, MS, Jako GJ et al. Laser Surgery in the Aerodigestive Tract. *Am J Surg* 1973; 126: 529-33.
3. Andrews AH & Polanyi TG. Microscopic and endoscopic surgery with the CO₂ laser. Bristol: John Wright & Sons Ltd.; 1982.
4. Stellar S, Polanyi TG, Bredemeier HC. Laser in surgery. In: Wolbarsht ML. *Laser applications in Medicine and Biology*. New York: Plenum Publishing Corp 1973; 2: 241-93.
5. Maiman TH. Stimulated optical radiation in ruby. *Nature* 1960; 187: 493.
6. Polanyi TG, Bredemeier HC, Davis JR. Lasers for surgical research. *Med Biol Eng* 1970; 8: 541-8.
7. Pinto JA. Microcirurgia com Laser de CO₂ e suas Aplicações em Otorrinolaringologia. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* 1986; 52: 26-35.
8. Mihashi S & Jako GJ et al. Laser surgery in otolaryngology: interaction of CO₂ laser and soft tissue. *Ann NY Acad Of Sciences* 1976; 267: 263-94.
9. Ossof R H, Coleman JA, Courey MS, Duncavage JA, Reinisch L, Wekhaven JA. Clinical applications of laser in otolaryngology – head and neck surgery. *Laser in Surgery Medicine* 1994; 15: 217-48.
10. Ossof RH, Reinisch L. *Laser Surgery*. In: Ossof RH. *The head and neck Nashville Vanderbilt Press* 1997; 36: 678-94.
11. Isshiki N. *Phonosurgery: theory and practice*. Tokyo: Springer-Verlag 1989; 7-11.
12. Hirano M. Phonosurgical Anatomy of the Larynx. In: Ford CN, Bless DM. *Phonosurgery: assesment and surgical management of voice disorders*. New York: Raven Press 1991; 3: 25-41.
13. Hirano M, Hirade Y, Kawasaki H. Vocal function following carbon dioxide laser surgery for glottic carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1985; 94 (3): 232-5.
14. Burian K, Hofler H. Zur mikrochirurgischen therapien von Stimmbandcarcinomen mit dem CO₂ laser. In: *Functional results after CO₂ laser surgery compared with conventional phonosurgery*. *T J of Laryngol and Otol* 1999; 113: 140-4.
15. Sataloff RT, Spiegel JR, Hawkshaw M, Jones A. Laser surgery of the larynx: the case for caution. *Ear Nose and Throat Journal* 1992; 71: 593-5.
16. Remacle M, Lawson G, Watelet JB. Carbon dioxide laser microsurgery of benign vocal fold lesions: indications techniques and results in 251 patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999; 108: 156-64.
17. Hormann K, Baker-Schreyer A, Keilmann A, Biermann G. Functional results after CO₂ laser surgery compared with conventional phonosurgery. *The J of Laryngol and Otol* 1999; 113: 140-4.
18. Zeitels SM. Laser versus cold instruments for microlaryngoscopic surgery. *Laryngoscope* 106 (5): 545-52.
19. Benninger MS. Microdissection or microspot CO₂ laser for limited vocal fold benign lesions: a prospective randomized trial. *Laryngoscope* 2000; 110: 1-17.
20. Sittel C, Eckel HE, Eschenburg C. Phonatory results after laser surgery for glottic carcinoma. *Otolaringol Head and Neck Surg* 1998; 119: 418-24.
21. Junqueira LC. Diferencial staining of collagens type I II and III by sirius red and microscopy. *Arch Histolol JPM* 1978; 41: 267-74.
22. Junqueira LC, Carneiro. *Histologia básica*. 9ª Ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan 1999; 5: 69-93.
23. Lapière CM. The ageing dermis: the main cause for the appearance of old skin. *Br J Dermatol* 1990; 122: 5-11.
24. Junqueira LC. Picrosirius staining plus polarization microscopy a specific method for collagen detection. *Histochem J* 1979; 11: 447-55.
25. Junqueira LC, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the picrosirius-polarizations methods. *Histochem* 1982; 74: 153-6.