



INVESTIGACIÓN ORIGINAL

RELACIÓN ENTRE LA LONGITUD DE LA CUERDA VOCAL Y LA COMPOSICIÓN HISTOLÓGICA DE LA LÁMINA PROPIA EN LARINGES PEDIÁTRICAS

Relationship between vocal cord length and histological composition of the lamina propria in pediatric larynxes

Julio César Torres Pazmiño¹, Eduardo Marrugo Pardo²

1. Residente III año Otorrinolaringología, Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.
2. Profesor Asociado, Unidad de Otorrinolaringología, Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

Correspondencia: jctorrespaz@unal.edu.co

Resumen

Antecedentes. La macro y microarquitectura de cuerda vocal del niño difiere notablemente de la del adulto, y se ha demostrado que en el proceso de madurez existen diferentes mecanismos que suceden hasta cierta edad. Los investigadores han mostrado sus resultados pero no hay mención de una herramienta clínica que permita su aplicación en la fonocirugía infantil.

Objetivo. Establecer la relación entre la longitud de la cuerda vocal con la composición histológica de la lámina propia en laringes pediátricas.

Material y métodos. Estudio observacional, descriptivo de cortes histológicos de cuerdas vocales de diferente longitud con aplicación de *software* de análisis de color y análisis estadístico de resultados con SPSS 17.0 trial versión.

Resultados. En 22 cortes histológicos de cuerda vocal se hallaron como características histológicas la presencia de hiperplasia, distribución de fibras al azar, presencia

de glándulas y de abundantes vasos sanguíneos en la lámina propia del tercio medio de la cuerda. El porcentaje de fibras colágenas depende en un 38,9 por ciento de la longitud de la cuerda vocal y el porcentaje de fibras elásticas en un 26,4 por ciento. Los valores de *p* para cada variable fueron de 0,040 y 0,061, respectivamente.

Discusión. No parece existir una relación directa entre el porcentaje de fibras colágenas y elásticas y la longitud de la cuerda vocal en niños. Dentro de las características histológicas destacadas se halló presencia de abundantes glándulas y vasos sanguíneos en la lámina propia a nivel del tercio medio de la cuerda vocal.

Palabras claves: cuerdas vocales (pliegues vocales), lámina propia (membrana mucosa), preescolar (infante), salud infantil (bienestar del niño).

Torres-Pazmiño J, Marrugo-Pardo E. Relación entre la longitud de la cuerda vocal y la composición histológica de la lámina propia en laringes pediátricas. *Rev.Fac.Med.* 2009; 57: 236-245.

Summary

Background. The macro and micro-architecture of an infant's vocal cord differs notably from that of the adult, and it has been demonstrated that during the maturation process there are mechanisms that occur until a given age. However, there is yet no mention of a clinical tool that would allow the assessment of these changes and could be applied to pediatric phono-surgery.

Objective. To assess the relationship between vocal cord length and histological composition of the *lamina propria* in pediatric larynxes.

Materials and methods. Cross-sectional study of histological specimens of vocal cords with different lengths. Microscopic images were studied with color-analysis software and statistical analyses were performed using SPSS® 17.0 for Windows.

Results. In 22 specimens of *lamina propria* from the middle third of the vocal cord, we evaluated cellularity, randomness of the distribution of fibers, presence of glands and abundance of blood vessels. The percent of collagen fibers depended in 38.9 percent ($p = 0,04$) on the length of the vocal cord, the corresponding percentage for elastic fibers was 26.4 percent ($p = 0,061$).

Conclusions. There seems to be no direct correlation between the percent of collagen and elastic fibers and vocal cord length in children. Among prominent histological features we found the presence of abundant glands and blood vessels at the middle third of the vocal cord.

Key words: vocal cord, mucous membrane, child, preschool, child welfare.

Torres-Pazmiño J, Marrugo-Pardo E. Relationship between vocal cord length and histological composition of the *lamina propria* in pediatric larynxes. *Rev.Fac.Med.* 2009; 57: 236-245.

Introducción

La laringe fue la primera estructura del tracto respiratorio que se estudió desde el punto de vista del desarrollo; para ello se utilizaron embriones de diferentes edades y tamaños que se estatificaron con el método Carnegie (1). A. Ferien fue quien inició los trabajos sobre la estructura en capas de la cuerda vocal y su relación con la producción de la voz; luego, en 1886, se estudió la laringe como un órgano en el que existen íntimas relaciones biomecánicas entre sus componentes. Pero fue hasta 1975 cuando Hirano demostró la composición real por capas de la cuerda vocal y definió los conceptos de cubierta y cuerpo del pliegue vocal (2).

El desarrollo laríngeo precisa de la adecuada participación e integración de determinadas líneas celulares que son precursores epiteliales y mesenquimales de la mucosa, el tejido

conectivo laxo y denso, músculos estriado y liso, vasos sanguíneos y nervios; dichos precursores convergen hacia la porción caudal de la faringe en el embrión. Al parecer existe una programación establecida que en algún punto del desarrollo se activa y se inicia el proceso de desarrollo, en el cual se presenta la expresión de una familia de genes llamada HOX, en el segmento 3' a 5' de los cromosomas; esta familia de genes se expresa en la cresta neural (tronco cerebral) y en los somitas (precursores vertebrales), además de otras estructuras embrionarias. De esta manera, es el primer arco branquial, derivado de la cresta neural, el que tendría un importante rol en la expresión de dichos genes, los cuales regirán el adecuado inicio del desarrollo. Lo anterior ha sido corroborado por experimentos animales en los cuales no se permite la expresión de los genes HOX, encontrando anomalías en laringe y tráquea al nacimiento (3).



Es importante repasar la anatomía de la laringe en el niño puesto que se presentan notables variaciones respecto a la del adulto, entre ellas:

- Posición del hueso hioides más alta, lo cual se asocia también con una laringe más cefálica en el niño.
- La forma del cartílago tiroideo es más redondeada, por lo cual no existe en la línea media la prominencia característica de dicha estructura.
- El cartílago cricoides no es palpable y muchas veces lo oculta el músculo cricotiroideo.
- La epiglotis adopta, especialmente en su cara lingual, una posición más horizontal, y aparece con aspecto enrollado en su vista superior.
- El espacio donde se ubica la membrana cricotiroidea es mínimo y no se logra palpar al intentar buscarla con el examen clínico.
- Los cartílagos aritenoides son notablemente grandes en la laringe pediátrica y ocultan gran parte de las cuerdas vocales, a la vez que por dicho tamaño dejan entre sí una pequeña hendidura que puede confundirse con patología congénita.
- La cuerda vocal tiene una inserción anterior más baja que la posterior, tiene algún grado de arqueamiento y su color (rosado) es igual al del resto de la mucosa de la laringe.
- La porción más estrecha en la laringe pediátrica se halla a nivel subglótico, mientras que en los adultos es a nivel del espacio de las cuerdas vocales (2).

La evolución de la laringología permitió definir la importancia de la lámina propia y de su composición en el proceso de la fonación; de los estudios realizados en laringes adultas se conoce que la capa intermedia está formada principalmente por fibras elásticas y la capa profunda por fibras colágenas; la elastina es una proteína que brinda resistencia en los tejidos, además de poseer excelentes propiedades elásticas. Sin embargo, estas se pueden ver reducidas por la interacción con fibras colágenas.

Dicha conformación va más allá de esta simple explicación, ya que la compleja estructura microscópica de la cuerda vocal implica un fundamental rol de la matriz extracelular y de la fisiología del músculo tiroaritenoides (4-7).

Con los trabajos publicados en la literatura médica mundial se concluyó que para la producción de la voz no sólo es necesaria una correcta disposición macroscópica de las estructuras sino también que la microanatomía de la cuerda, y especialmente de la matriz extracelular, debe estar dispuesta adecuadamente para que la viscoelasticidad cumpla su trabajo. La pregunta surge cuando intentamos definir cuál es el momento en el que la madurez histológica de la cuerda vocal se ha completado y la intervención quirúrgica de la misma no afectará sus propiedades vibratorias.

Hirano (1975) postuló en su libro *Phonosurgery. Basic and Clinical Investigation* la conformación en capas de la cuerda vocal a la vez que mostró datos referentes a la relación de la longitud de cuerda vocal con la edad, en los que menciona que la longitud promedio de la cuerda en un recién nacido es de 2,5 a 3 mm, en hombres adultos es de 17 a 21 mm y en mujeres adultas de 11 a 15 mm, y que la longitud de la porción membranosa respecto de la cartilaginosa es casi igual en neonatos, a diferencia de los adultos, donde la membranosa puede llegar a ser cuatro a cinco veces más larga. Un año más tarde Tucker realizó un trabajo donde demostró que las características del epitelio de la cuerda vocal son iguales en laringes de neonatos y adultos y que lo que varía son los patrones de barrido ciliar a través de las etapas de la vida. Hirano retomó el tema del desarrollo de la cuerda y en 1983 publicó los resultados de uno de sus trabajos donde definió que la cuerda vocal del neonato no tiene una estructura por capas definida y que no existe un ligamento vocal en dicha estructu-

ra; Gray, junto con Hirano y Sato (1993), publicaron en el libro *Vocal Fold Physiology* su opinión acerca de la densidad de fibras elásticas y del colágeno, cómo tal varía con la edad pero la densidad de las fibras colágenas no cambia (6).

En el año 1984 Hirano trabajó con un grupo de Zagreb, Yugoslavia, encabezado por Subotic, y llevaron a cabo un estudio en cuerdas vocales de fetos de 13, 16, 18 y 23 semanas, y en estructuras con mucosa de la vía aerodigestiva de los mismos, y no hallaron en las cuerdas la presencia franca de fibras elásticas; identificaron que el desarrollo de la mucosa de la cuerda vocal sigue un patrón diferente al de la mucosa de otros sitios, y que la mácula flava está programada para influir en el desarrollo y organización del tejido conectivo de la lámina propia (8). Este último dato es corroborado por Vecerina-Volic y cols. algunos años después en una publicación donde describen las características de la mácula flava y su consistencia histomorfológica durante la vida fetal (9).

Campos Bañales y cols. publicaron en 1995 un trabajo con laringes adultas, de niños y de fetos, y vuelven a destacar la mácula flava como la precursora del ligamento vocal, pero además postulan que posiblemente el evento que dispara la activación de las máculas para metabolizar sea la contracción muscular fruto de los primeros intentos de fonación en el niño; además destacan la presencia de fibras colágenas en todos los grupos estudiados pero siendo escasa en la vida fetal y abundantes en la adulta (10).

Hammond (1998) y cols. realizaron una investigación buscando determinar la cantidad de fibras elásticas de la cuerda vocal y su relación con el género y con la edad; para ello utilizaron piezas de niños, adultos y ancianos y sus resultados mostraron que no hay diferencia con el género pero que en función de la edad; sí hay un

incremento en la cantidad de las fibras elásticas de la capa intermedia de la lámina propia que incluso altera la capa superficial, casi borrándola; este último dato no va de acuerdo a otras opiniones, donde se considera que a mayor edad menor cantidad de fibras elásticas (11).

Ishii (2000) y cols. presentaron un estudio donde con laringes pediátricas demostraron que a los 10 años de edad ya se hallan estructuras superficiales y profundas, a los 12 años una capa superficial de la lámina propia, y a los 17 años ya está definida la estructura de la cuerda vocal tal como se halla en el adulto (12).

Sato, Hirano y Nakashima (2001) iniciaron un estudio con el objetivo de describir de manera detallada la estructura de la porción membranosa de la cuerda vocal en neonatos y niños y clarificar cómo es el proceso de crecimiento de la mucosa de la misma después del nacimiento. Dentro de sus hallazgos se destacan los siguientes (13):

- El espacio de Reinke está formado, en los neonatos, por una sustancia de soporte y de fibras sueltas.
- En la mácula flava del neonato los fibroblastos empiezan a sintetizar colágeno, fibras reticulares y elásticas.
- En los infantes los fibroblastos de la mácula flava toman una forma estrellada e inician la síntesis de matriz extracelular; además, en la misma mácula también se produce gran cantidad de ácido hialurónico.
- Después del nacimiento el colágeno y las fibras reticulares sintetizadas en la mácula flava migran hacia la zona media de la porción membranosa de cuerda vocal.
- La fibronectina es la encargada de la orientación del colágeno y del depósito de las fibras reticulares y va disminuyendo a medida que el componente fibroso del espacio de Reinke aumenta.



- Las fibras elásticas se incrementan después de que el colágeno y las fibras reticulares aumentan en el espacio de Reinke.

Hartnick y cols. (2005) efectuaron un estudio con laringes de diferentes edades, de 0 a 18 años, reportando que entre el nacimiento y el primer mes se halla una estructura de una sola capa hiper celular en la cuerda vocal, hacia los dos meses se evidencia el primer signo de una diferenciación en bilaminar donde se pueden evidenciar dos poblaciones celulares de distinta densidad, entre los dos meses y los cinco años se evidencia la misma estructura bilaminar y además el origen de una tercera capa más hipocelular adyacente al músculo vocal, hacia los siete años existe una definida diferencia entre una capa profunda e intermedia, pero es solo hasta los 13 años que se define la lámina propia y termina su maduración durante la adolescencia.

Hartnick y Boseley (2006) corroboraron los datos del estudio anterior y además añaden información acerca de la profundidad de la capa superficial de la lámina propia diciendo que el porcentaje de dicha profundidad en la cuerda va decreciendo con la edad y hacia los siete años corresponde al 22 por ciento del total de la lámina propia y a los 10 años equivale al porcentaje del adulto (14).

Dentro de las patologías laríngeas en los niños es posible encontrar enfermedades de la voz y siempre se debe intentar descartar un origen orgánico, los nódulos son las lesiones del borde libre de la cuerda más frecuentes y su manejo significa un reto para el especialista. Se consideró que la necesidad de intervenir con cirugía depende de la edad, de la urgencia de mejoría y de la no respuesta a otros manejos. Para Mori (1999) los pacientes sometidos a cirugía presentaron casi en su totalidad mejoría e incluso normalidad en la voz (15,16).

Los datos presentados por los investigadores a nivel mundial en relación con la madurez de la lámina propia son producto de trabajos practicados en cadáveres, en los cuales se logró establecer un posible rango de edad en el que se tendría la madurez apropiada para que la fonocirugía se pudiera realizar; sin embargo, hace falta en muchos casos, donde el paciente está en el límite de edad, disponer de un instrumento que permita definir la pertinencia de la intervención quirúrgica.

Aunque en nuestro medio no existen estadísticas acerca de la frecuencia de lesiones de borde libre de cuerda vocal en niños, sí se hace importante conocer si las características histológicas del pliegue vocal son similares a las halladas en la literatura mundial, y además poder establecer una posible herramienta que permita en el paciente sugerir datos acerca de la madurez de la lámina propia.

Con el presente trabajo se pretende validar una hipótesis a este respecto a través de la investigación usando como variables el tamaño de la cuerda vocal y su relación con la histología de la lámina propia.

Material y métodos

Estudio observacional-descriptivo en el que se tomó una muestra de 12 piezas anatómicas correspondientes a laringes de archivo conservadas adecuadamente en formol y que fueron revisadas para descartar la presencia de alteraciones macroscópicas; se escogieron 10 piezas, agrupándolas por tamaño macroscópico, y las otras dos por ser laringes de adultos se usaron como comparación teniendo en cuenta valores de la literatura. Bajo visión con microscopio se identificó y disecó la apófisis vocal de la cuerda vocal derecha de cada laringe y se procedió a medir la longitud (milímetros) de la misma en su porción membranosa desde la comisura ante-

rior hasta el proceso vocal; luego se realizó, en todas las muestras, a nivel del tercio medio de dicha porción membranosa, un corte coronal para llevar este fragmento al proceso convencional hasta la tinción histológica, usando coloración para elastina y para colágeno.

Una vez obtenidas las láminas se procedió a revisarlas con microscopio de luz (Olympus) para identificar su estructura desde el epitelio hasta el músculo vocal y se tomó fotografía con cámara (Nikon) acoplada a microscopio, obteniendo un total de 24 imágenes.

Las imágenes fueron llevadas a un computador, donde, con el programa ImageJ y Color Measure, se procesó inicialmente la lámina de control de las coloraciones para determinar los valores RGB tanto para elástica como para colágeno. Luego esos mismos valores se aplicaron a cada una de las imágenes obtenidas para conocer, con un índice de tolerancia a variación del color del 10 por ciento, cuál era el porcentaje del color. Este valor correspondería a la cantidad de fibras elásticas y colágenas en el corte histológico.

Los valores fueron procesados con el software SPSS (SPSS Inc.) versión 16 trial, aplicándose un modelo de regresión tipo S en el cual se correlacionan dos variables continuas: longitud contra porcentaje de fibras elásticas o colágenas.

Resultados

Se obtuvieron 23 imágenes aptas para someter al programa de análisis de color, ya que una lámina de tinción para elástica de una de las laringes pediátricas presentó una deficiente calidad que no permitía incluirla, por lo tanto su pareja con coloración para colágeno también se retiró del análisis y se terminó trabajando con 22 fotografías.

En los datos encontrados referentes a la longitud y los porcentajes de elastina y colágeno no se evidenció que exista una relación consistente entre dichas variables, ni siquiera en las cuerdas vocales de adulto.

Dentro de las observaciones sobre las características morfológicas de la cuerda vocal, específicamente su tercio medio, se halló que en todas las laringes pediátricas había presencia de: hiper celularidad, distribución de fibras al azar, presencia de glándulas y de abundantes vasos sanguíneos.

En lo referente a la aplicación del modelo de regresión logística, se relacionó primero la longitud de la cuerda vocal contra el porcentaje de fibras colágenas teniendo en cuenta que la hipótesis postulada reza que: la longitud de la cuerda es un elemento para determinar el porcentaje de composición de fibras colágenas y elásticas. De esta manera la variable independiente es longitud y la dependiente porcentaje de colágeno. Los resultados, después de realizar el análisis estadístico con el *software* elegido, son los mostrados en las tablas 1 y 2.

La R tiende hacia el +1 y sugiere alguna posible relación. La R cuadrada indica que el valor del porcentaje, explicado pero no causado, de colágeno que depende de la longitud, es del 38,9 por ciento. En el resumen de la Anova se observó un valor de F que junto con la $p < 0,05$ y el valor negativo de β (*beta*) sugiere una posible relación entre la longitud de la cuerda y porcentaje de colágeno de tipo a menor longitud menor porcentaje de fibras colágenas.

La figura 1 muestra la dispersión de los valores que no se concentran hacia arriba y hacia la izquierda aunque el valor de error estándar de estimación no sea alto (0,916). Las tablas 3 y 4 exponen los resultados al usar la variable



Tabla 1. Resumen del modelo para colágeno

R	R cuadrada	R cuadrada corregida	Error estándar de estimación
.624	.389	.321	.916

Variable independiente es longitud.

Tabla 2. Coeficientes de regresión para colágeno

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	T	Sig.
	B	Error estándar	Beta		
1 / longitud	-15.185	6.344	-.624	-2.394	0.040
(Constante)	4.708	.830		5.672	.000

Variable dependiente es colágeno.

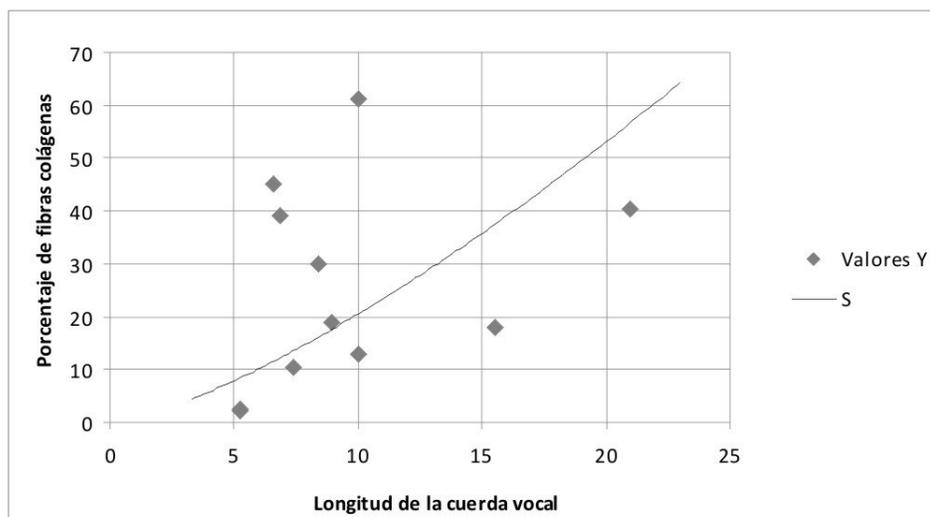


Figura 1. Porcentaje de fibras colágenas con relación a longitud de cuerda vocal

elastina. El valor de R sugiere que quizás no exista relación, lo que comprobaría la hipótesis nula. La R cuadrada indica que el valor del porcentaje de elastina, explicado pero no causado, que depende de la longitud, es del 26,4 por ciento. En el resumen de la Anova se observa un valor de F que, junto con la significancia, definitivamente no sugiere una posible relación directa entre longitud de la cuerda y porcentaje de

fibras elásticas. El valor de β no es soportado por un adecuado valor de p . El gráfico 2 muestra a los valores sin ninguna tendencia a concentrarse.

Discusión

Los trabajos previos de otros autores evidencian una madurez histológica de las cuerdas vo-

Tabla 3. Resumen del modelo para elastina

R	R cuadrada	R cuadrada corregida	Error estándar de estimación
.581	.338	.264	1.952

Variable independiente es longitud.

Tabla 4. Coeficientes de regresión para elastina

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	T	Sig.
	B	Error estándar	Beta		
1 / longitud	28.952	13.512	.581	2.143	0.061
(Constante)	-1.935	1.768		-1.094	.302

Variable dependiente es elastina.

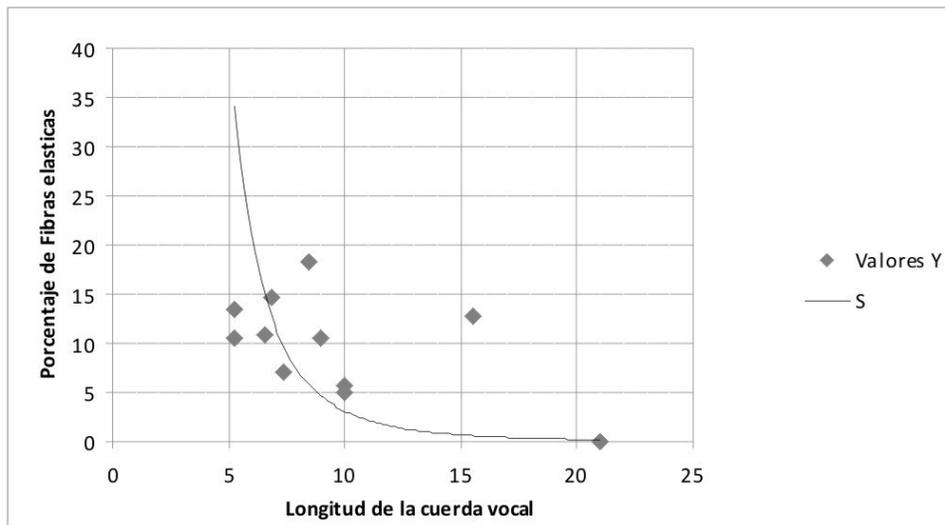


Figura 2. Porcentaje de fibras elásticas con relación a longitud de cuerda vocal

cales similar a la del adulto, por encima de los 12 años, sin embargo consideran que durante el resto de la adolescencia el proceso cumple otras etapas finales. Hasta ahora solamente se ha podido establecer esa edad a través de estudios en cadáveres, en los cuales muchas veces se presentan datos diferentes; esto hace que quede un vacío en el conocimiento referente a la

disponibilidad de un medio diagnóstico para determinar en el niño, con una mayor exactitud, el grado de madurez de la cuerda vocal y específicamente de la lámina propia.

En el presente estudio se observa que la distribución del porcentaje de fibras es variado y no se logra establecer una verdadera relación di-



recta entre la longitud y la cantidad de fibras elásticas y colágenas, ni siquiera en la laringe adulta. Incluso entre cuerdas vocales de longitud similar se encuentran notables variaciones. Este hecho de por sí pone de manifiesto la posibilidad de que la hipótesis no se compruebe.

Es posible que por el tamaño de las cuerdas, estas correspondan a edades inferiores a los 12 años, en donde el proceso de maduración va en curso, y que definitivamente a pesar de demostrarse en el trabajo de Hartnick (2005) que existe una secuencia cronológica del desarrollo, deben existir mecanismos aún no elucidados en este proceso que hacen que en cada laringe la madurez sea única.

Se lograron determinar características de la cuerda vocal en nuestra población que son similares a las ya detalladas en otras partes del mundo, como la presencia de mucha hiper celularidad, distribución de fibras al azar y mayor grosor del epitelio. Llama la atención dos hallazgos vistos de manera consistente y que son poco descritos en otras publicaciones, como lo es la presencia de glándulas en el tercio medio de la porción membranosa de la cuerda, así como una importante presencia de vasos sanguíneos en la misma zona.

Es posible que el proceso y la técnica de coloración no permitieran una mejor calidad en las características del color, lo cual hizo más difícil identificar valores RGB más precisos; sin embargo, soportándose en principios de la teoría del color, esa precisión es imposible lograrla. Podría haberse usado un nivel de tolerancia al color más alto durante el proceso de determinar el valor en porcentaje, pero siempre se pensó en dar mayor precisión a los resultados. Aunque los datos estadísticos parecieran confirmar la hipótesis nula, la cual establece que la longitud de la cuerda no es un elemento para determinar el porcentaje de composición de fibras colágenas y

elásticas, debe considerarse que si se logran mejorar los aspectos técnicos de las tinciones, y con un mayor número de muestras, podría darse un resultado distinto, ya que los valores de la estadística no estuvieron volcados en su totalidad hacia la negación de la hipótesis.

En nuestro país no existen publicaciones similares a ésta, por lo cual, consideramos que el presente trabajo puede servir de plataforma para la generación de investigaciones en el área que permitan describir con mejor consistencia los datos que en este artículo se presentan.

Conclusiones

En laringes de niños colombianos parece no existir una relación entre la longitud de la cuerda vocal en su porción vibratoria y la presencia de fibras colágenas y elásticas. Se observó la presencia importante de glándulas y vasos sanguíneos en el tercio medio de la porción membranosa de la cuerda.

Es necesario tener más muestras y mejorar la técnica de tinción para así tener un adecuado poder estadístico en el estudio.

Se debe trabajar sobre una herramienta que permita utilizar alguna variable de la cuerda vocal en el paciente pediátrico para usarla como parámetro de madurez histológica.

Este trabajo se constituye en punto de referencia para el desarrollo de proyectos de investigación en nuestro país que ofrezcan mayor consistencia.

Referencias

1. **Bailey B, Biller H.** Developmental anatomy of the larynx. En: W.B. Saunders Company. Surgery of the larynx. 1985: 3-14.

2. **Tucker JA.** Development of the human air and food passages. En: *The Larynx A Multidisciplinary Approach*. 2nd ed. Mosby. 1996; 15-24.
3. **Laitman J, Noden D, Van De Water T.** Formation of the larynx: From Hox Genes to Critical Periods. En: *Diagnosis and Treatment of Voice Disorders*. 3rd ed. Plural Publishing Inc. 2006; 3-20.
4. **Sato K.** Functional Fine Structures of the Human Vocal Fold Mucosa. En: *Diagnosis and Treatment of Voice Disorders*. 3rd ed. Plural Publishing Inc. 2006; 47-54.
5. **Hartnick CJ, Rehbar R, Prasad V.** Development and maturation of the pediatric human vocal fold lamina propria. *Laryngoscope*. 2005; 115: 4-15.
6. **García-Tapia R.** Estructura histológica de la cuerda vocal. Diagnóstico y tratamiento de los trastornos de la voz. Ed. Garsi. 1996; 48-53.
7. **Sanders I.** The Microanatomy of the vocal fold musculature. *Diagnosis and Treatment of Voice Disorders*. 3rd ed. Plural Publishing Inc. 2006; 55-72.
8. **Suboti R, Vecerina S, Krajina Z, Hirano M, Kurita S.** Histological structure of vocal fold lamina propria in foetal Larynx. *Acta Oto-Laryngologica*. 1984; 97: 403-406.
9. **Veerina-Voli S, Hirano M, Karovic-Krzelj V.** Macula flava in the vocal fold of human fetus. *Acta Oto-Laryngologica*. 1988; 105: 144-148.
10. **Campos Baiiales ME, Pérez Piñero B, Rivero J, Ruiz Casal E, López Aguado D.** Histological structure of the vocal fold in the human larynx. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1995; 115: 701-704.
11. **Hammond TH, Gray SD, Butler J, Zhou R, Hammond E.** Age- and gender-related elastin distribution changes in human vocal folds. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998;119: 314-322.
12. **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;109:1055-1064.
13. **Sato K, Hirano M, Nakashima T.** Fine structure of the human newborn and infant vocal fold mucosae. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001;110:417-424.
14. **Boseley M, Hartnick C.** Development of the Human True Vocal Fold: Depth of Cell Layers and Quantifying Cell Types Within the Lamina Propria. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006; 115: 784-788.
15. **Hirschberg J, Dejonckere PH, Hirano M, Mori K, Schultz-Coulon H, Vrticka K.** Voice disorders in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1995; 32 Suppl, S109-S125.
16. **Mori K.** Vocal fold nodules in children: preferable therapy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1999; 49 Suppl, S303-S306.