



Brazilian Journal of OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org



ARTIGO ORIGINAL

Efeito da aplicação de cola de fibrina na cicatrização de pregas vocais após manipulação cirúrgica em coelhos[☆]

Fernanda da Silva Santos ^{a,*}, Felipe Hideo Ikeda ^a, Mirna Duarte Barros ^b
e André de Campos Duprat ^a

^a Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, Departamento de Otorrinolaringologia, São Paulo, SP, Brasil

^b Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, Departamento de Morfologia, São Paulo, SP, Brasil

Recebido em 18 de dezembro de 2020; aceito em 15 de abril de 2021

DESTAQUES

- Avaliação do efeito profilático dos selantes em cirurgias de laringe que requerem extenso descolamento da cobertura das pregas vocais.
- Incisão em toda a extensão da prega vocal, seguida de secção anterior e posterior da mucosa, criando um retalho pediculado.
- A cola de fibrina induziu maior fibrogênese na prega vocal em fase tardia do processo de cicatrização.

PALAVRAS-CHAVE

Laringe;
Adesivo de tecido de
fibrina;
Coelhos;
Cordas vocais;
Fibrose

Resumo

Introdução: Um desafio na fonocirurgia é conseguir uma boa qualidade vocal com o mínimo de fibrose das pregas vocais. A cola de fibrina pode ser aplicada para minimizar a fibrose; porém, seu uso na laringe é baseado principalmente na experiência clínica, particularmente em lesões extensas.

Objetivo: Avaliar o efeito da aplicação da cola de fibrina na concentração de colágeno na fase tardia do processo de cicatrização, após o descolamento do retalho pediculado da cobertura da prega vocal em coelhos.

Método: Neste estudo prospectivo com animais, 12 coelhos adultos machos foram submetidos à microcirurgia de laringe, na qual uma incisão foi feita em toda a extensão de ambas as pregas vocais, seguida de extenso descolamento da mucosa e secção das extremidades da incisão. A cola de fibrina foi aplicada na prega vocal esquerda e a mucosa foi reposicionada. Na prega vocal direita, a mucosa foi reposicionada sem tratamento com cola de fibrina. Após três meses, os coelhos foram sacrificados. Análises histológicas foram feitas e os dados coletados foram submetidos à análise estatística.

DOI se refere ao artigo: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2021.04.005>

[☆] Como citar este artigo: Santos FS, Ikeda FH, Barros MD, Duprat AC. Effect of application of fibrin glue on vocal fold healing after surgical manipulation in rabbits. Braz J Otorhinolaryngol. 2022;88:S102–S107.

* Autor para correspondência.

E-mails: fernandasantos.otorrino@gmail.com, drafernandassantos.01@gmail.com (F.S. Santos).

A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

Resultados: As pregas vocais tratadas com cola de fibrina apresentaram maior concentração de colágeno na coloração tricrômica de Masson e concentração significativamente maior de colágeno ($p < 0,05$) na coloração com *picrosirius red* comparadas às pregas vocais controle.

Conclusão: O tratamento com cola de fibrina resultou em maior fibrogênese das pregas vocais no presente estudo. Contudo, novos estudos são necessários para determinar o efeito profilático dos selantes em cirurgias de laringe que requerem extenso descolamento da cobertura das pregas vocais.

© 2022 Publicado por Elsevier Editora Ltda. em nome de Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

A prega vocal (PV) é composta por epitélio escamoso estratificado, lâmina própria (LP) e tecido muscular. Hirano introduziu o conceito de “cobertura” formada pelo epitélio e pela camada superficial da LP, que desliza sobre o “corpo” (camadas intermediárias e profundas da LP, também conhecidas como ligamento vocal e músculo vocal), permitindo que as PVs vibrem.^{1,2} A presença de fibrose na cobertura pode interferir na vibração, causando disfonia.

Um desafio na fonocirurgia é conseguir uma boa qualidade vocal com o mínimo de fibrose na PV. Os tratamentos atuais para a cicatrização da PV apresentam resultados insatisfatórios.³ Portanto, é fundamental investigar os mecanismos de prevenção de fibrose na PV.

Os melhores resultados cirúrgicos são obtidos quando há melhor preservação de uma estrutura sadia da LP da prega vocal, diminuindo a resposta inflamatória e a formação de tecido cicatricial.^{4,5} *Microflap* é uma técnica bem estabelecida para remoção de lesões benignas,⁴ que consiste em descolar a camada superficial da LP sem lesar o ligamento vocal, minimizando a formação de tecido cicatricial. Em alguns casos, as lesões podem afetar grande parte da PV, podendo aumentar a fibrose devido à manipulação cirúrgica mais significativa.

O uso de cola de fibrina (CF) pode minimizar a fibrose gerada pela cirurgia. Pode ser aplicado na PV para anexar retalhos de mucosa e colocar enxertos no espaço de Reinke para melhorar a cicatrização.^{6,7} No entanto, poucos estudos avaliaram sua eficácia e, na prática clínica, a CF é usada de acordo com a experiência do cirurgião.

Portes et al. relataram o efeito da CF na cicatrização de PVs em porcos após colocar o selante em uma bolsa criada na PV e observaram que a área ocupada por fibras de colágeno era maior nas PVs fixadas com o selante que nas bolsas das PVs sem selante.⁷ Scapini et al. compararam a cicatrização de PV em coelhos após a colocação de um enxerto de fâscia, com e sem CF, e observaram que a concentração de fibras de colágeno aumentou em torno da fâscia com CF 90 dias após a colocação do enxerto.⁸

Esses estudos avaliaram o efeito da CF em retalhos criados em pequenas áreas das PVs. No entanto, nenhum estudo analisou o processo de cicatrização em lesões extensas que acometem o epitélio de toda a extensão das PVs. Nas lesões extensas ocorre perda mais significativa da

mucosa da PV normal durante a cirurgia, deixando áreas do ligamento vocal expostas, o que pode resultar em mais cicatrizes. Nessas situações, é necessário cobrir o ligamento vocal exposto com o epitélio remanescente para diminuir a fibrogênese. Os selantes ajudam a unir as margens da incisão, diminuindo potencialmente a fibrogênese, em comparação com a união do epitélio sem qualquer assistência.

O presente estudo avaliou o efeito da CF em procedimentos extensos de PV em fase tardia do processo de cicatrização.

Método

O comitê de ética em pesquisa animal aprovou este estudo (protocolo nº 2151-14). Todos os procedimentos de cuidado com os animais foram feitos de acordo com a lei federal Brasileira (11.974/2008) e as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram selecionados 12 coelhos Nova Zelândia, machos, adultos e saudáveis, pesando 3,5–4,5 kg. Foram excluídos os animais que apresentaram sinais e sintomas de doenças preexistentes, desenvolveram complicações durante o período de observação ou morreram durante esse período. Cada animal recebeu atropina 0,1 mg/kg por via subcutânea, acepromazina 0,1 mg/kg, cetamina 40 mg/kg e xilazina 10 mg/kg por via intramuscular como medicação pré-anestésica e foram anestesiados com cetamina 20 mg/kg e diazepam 4 mg/kg. Cada coelho foi posicionado em decúbito dorsal com hiperextensão cervical. Tricotomia cervical e assepsia da região cervical foram feitas imediatamente antes da cirurgia.

Uma incisão cervical anterior de dois centímetros na linha média foi feita e o tecido foi retraído para o pericôndrio da cartilagem tireoide. Laringofissura foi feita do meio da cartilagem tireoide até a membrana cricotireoidiana e, ao microscópio, foi feita incisão na face superior em toda a extensão de ambas as PVs, seguida de extenso descolamento da mucosa e secção anterior e posterior da mucosa, criando um retalho pediculado (fig. 1).

Na PV esquerda, 0,1 mL de Evicel® (Ethicon Inc., Somerville, NJ) CF (fibrinogênio, 55–85 mg/mL; trombina, 800–1200 UI/mL; cloreto de cálcio, 5,6–6,2 mg/mL) foi aplicado seguido de reposicionamento do retalho. Na PV direita, o retalho foi posicionado sem CF. A cartilagem, a musculatura cervical e a pele foram reparadas com sutura de prolene 5.0.

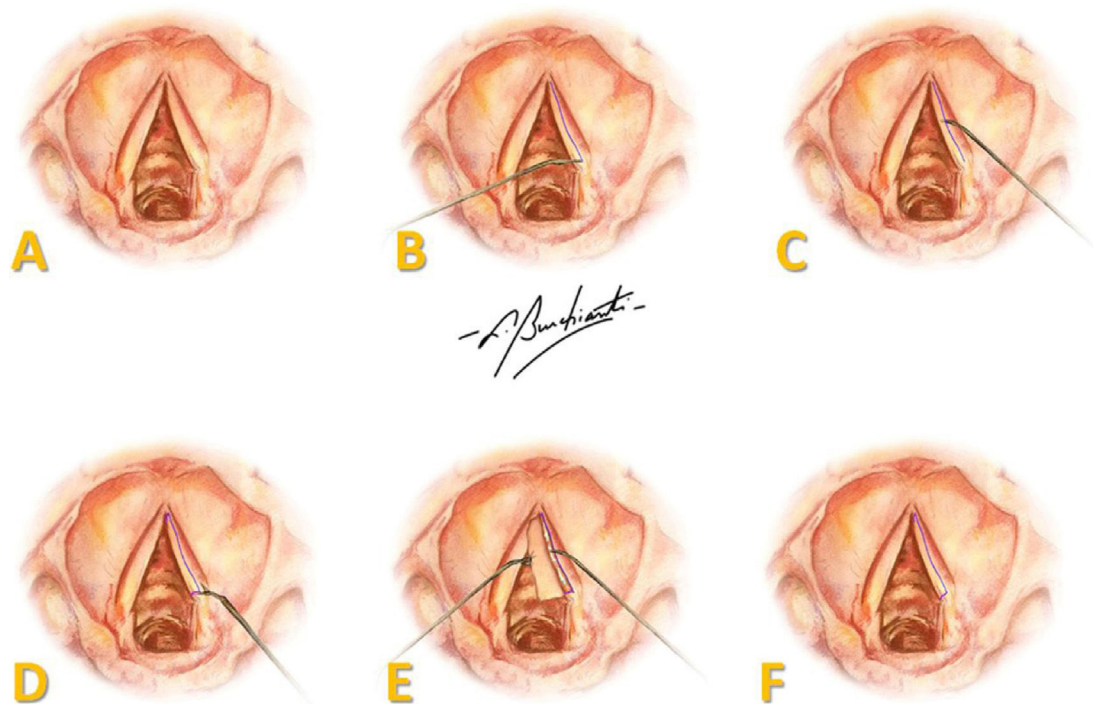


Figura 1 Representação do procedimento cirúrgico em pregas vocais humanas: (A) visão endoscópica de PVs; (B) incisão na face superior de toda extensão da PV; (C) descolamento da mucosa; (D) secção da mucosa; (E) retalho pediculado com CF no ligamento vocal; (F) reposicionamento do retalho sobre o ligamento vocal. Arte de Burchianti LC.

Após o procedimento, os animais foram observados por um período de três meses, seguido de eutanásia. O espécime cirúrgico (estruturas desde a epiglote até o primeiro anel traqueal) foi retirado pelo local da incisão e fixado em solução de formol a 10%.

A laringe foi isolada e seccionada em hemilaringe direita e esquerda. Após a identificação macroscópica das PVs, foi retirado o tecido constituído de 3 mm da supraglote, PV e 3 mm da subglote, encaminhado ao departamento de morfologia para processamento. Secções dos tecidos de cada PV foram preparados e corados com hematoxilina e eosina (HE), para determinar a localização precisa das PVs e a fase do processo inflamatório, e *picrosirius red* e tricrômico de Masson, para determinar a área ocupada pelo colágeno na LP de cada PV.

As lâminas coradas com tricrômico de Masson e *picrosirius red* foram digitalizadas e as imagens foram salvas no *software* de visualização panorâmica (3D HISTECH Ltd.) com ampliação de 5×. Os parâmetros de cor e as unidades de medida foram ajustados no *software* Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics) e as áreas a serem analisadas, que consistiam na região subepitelial (sem o músculo vocal), foram delimitadas manualmente. O *software* calculou a porcentagem de área ocupada pelas fibras de colágeno nas LPs das PVs.

As características quantitativas foram expressas em média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo e foram comparadas entre os lados esquerdo e direito por meio do teste pareado dos postos sinalizados de Wilcoxon;⁹ valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

Resultados

Seis animais foram perdidos durante o período de acompanhamento de três meses: um coelho aos nove dias de pós-operatório devido à desidratação e cinco devido a abscessos cervicais no local da incisão (quatro aos 60 dias e um aos 90 dias de pós-operatório). Portanto, apenas seis coelhos foram incluídos no estudo atual.

Seis laringes foram avaliadas. Cortes de tecido corados com tricrômico de Masson determinaram a área ocupada pelo colágeno (fig. 2).

Nas PVs do grupo intervenção, os valores variaram de 11,593% a 81,552%, com média de 26,619%, enquanto as PVs do grupo controle variaram de 3,700% a 34,026%, com média de 17,783%; as diferenças não foram significativas ($p = 0,917$) (tabela 1).

A área ocupada pelas fibras de colágeno também foi determinada nos cortes corados com *picrosirius red* (fig. 3).

Nas PVs com CF, a área ocupada pelas fibras de colágeno variou de 28,261% a 58,7935%, com média de 37,494%, enquanto no grupo controle o percentual variou de 12,420% a 44,933%, com média de 20,259%. Essas diferenças foram significantes ($p = 0,046$) (tabela 2).

Discussão

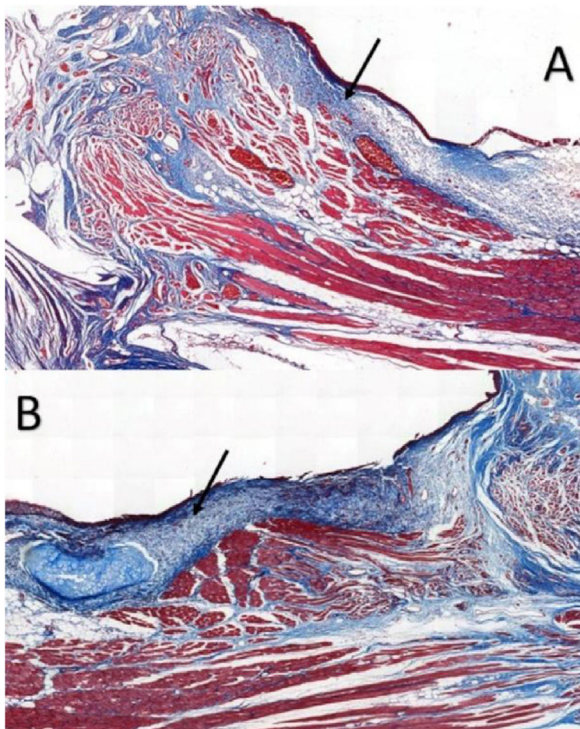
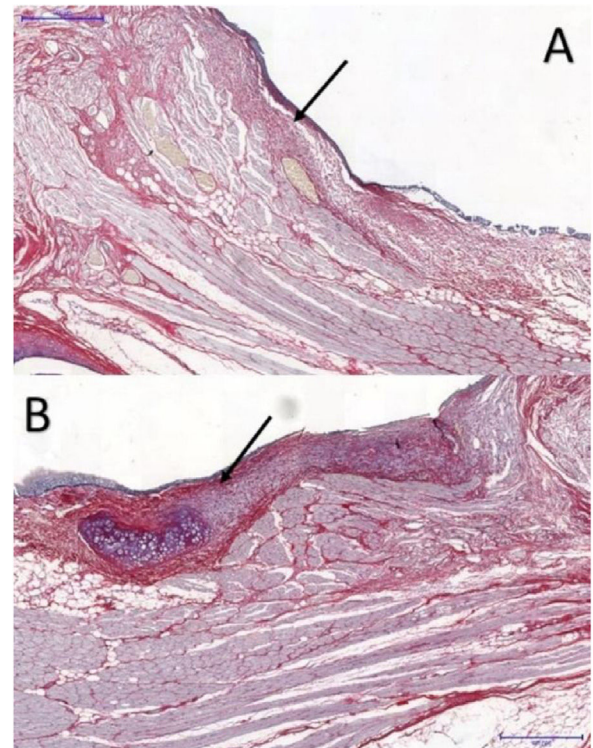
Em contraste com outros estudos,^{4,7,8,10,11} o estudo atual avaliou o efeito de longo prazo da CF na formação de tecido cicatricial (colágeno) após o descolamento extenso da cobertura da PV (microflap). Postulou-se que a CF poderia

Tabela 1 Área das fibras de colágeno nos cortes corados com tricrômico de Masson. Os dados foram analisados usando o teste pareado de classificação de Wilcoxon

	Prega vocal fixa com cola de fibrina (n = 6)	Prega vocal de controle (n = 6)	p-valor
Tricrômico de Masson			0,917
(%) média ± DP	26,6 ± 27	17,8 ± 11	
(%) mediana (min; max)	17 (11,6; 81,6)	18,5 (3,7; 34,0)	

Tabela 2 Área ocupada pelas fibras de colágeno nos cortes de tecido corados com *picrosirius*. Os dados foram analisados usando o teste pareado de classificação de Wilcoxon

	Prega vocal fixa com cola de fibrina (n = 6)	Prega vocal de controle (n = 6)	p-valor
Picrosirius			0,046
(%) média ± DP	37,5 ± 11,9	20,3 ± 12,5	
(%) mediana (min; max)	32,8 (28,3; 58,8)	15,7 (12,4; 44,9)	

**Figura 2** Cortes corados com tricrômico de Masson em coelhos com aumento de 5×: (A) PV de controle; (B) PV com cola de fibrina. As setas apontam para a região subepitelial das PVs. Observe a maior concentração de colágeno na parte B, em azul.**Figura 3** Cortes de tecido corados com *picrosirius red* com ampliação de 5×: (A) PV de controle; (B) PV com CF. As setas apontam para a região subepitelial das PVs. Observe a maior concentração de colágeno na parte B, em vermelho.

minimizar a cicatrização das pregas vocais em procedimentos como a remoção de edema de Reinke extenso e cirurgias do sulco estria-maior, mas, até o momento, os estudos em modelos animais não apoiaram tais achados.^{7,8,11}

Os coelhos foram escolhidos por sua disponibilidade, tamanho da laringe, baixa vocalização e baixo custo.^{12,13} Além disso, as PVs dos coelhos são distribuídas em três camadas com um aumento gradual na concentração de fibra

de colágeno,¹² conforme observado em humanos. Coelhos machos foram selecionados por apresentarem laringe maior e por evitar variações hormonais durante o processo de cicatrização.

O procedimento foi feito por meio de laringofissura, pois essa técnica permite uma melhor visualização das estruturas laringeas, permite uma manipulação mais precisa dos tecidos e é uma forma bem estabelecida de acesso à laringe em coelhos.¹⁴ No entanto, a laringofissura é mais invasiva que as técnicas endoscópicas e pode causar mais complicações.¹⁵ No presente estudo, a laringofissura foi feita em 12 coelhos, ocorrendo seis óbitos, cinco deles por abscesso cervical com mais de 60 dias após o procedimento. Essas complicações foram atribuídas principalmente a infecções de pele transmitidas entre os coelhos confinados juntos durante o período do estudo. Quando os primeiros sintomas de infecção apareceram, os animais doentes foram isolados, mas a transmissão pode ter ocorrido em uma fase subclínica.

Para este estudo, os coelhos foram sacrificados três meses após a cirurgia para avaliar cicatrizes maduras e os efeitos no longo prazo do tratamento com CF. Embora Rousseau et al. tenham indicado que os estudos deveriam avaliar a cicatrização das pregas vocais a longo prazo em coelhos por seis meses,¹⁰ esse prazo aumenta significativamente os custos e a possibilidade de complicações. Além disso, o aumento das fibras de colágeno e sua organização em grandes feixes observados por Rousseau et al. podem ocorrer com um tempo de avaliação que varia de três a seis meses. Portes et al. examinaram as PVs de seis porcos três meses após a cirurgia,⁷ e Scapini et al. avaliaram os efeitos da colocação de fásia com e sem CF em até 90 dias após o procedimento.⁸ Além disso, Maunsell et al. avaliaram os efeitos no curto e longo prazo do tratamento com CF e sutura na cicatrização de PV após sete e 90 dias, respectivamente.¹¹

Estudos anteriores avaliaram a cicatrização da PV após a aplicação da técnica de *microflap* em uma pequena área da PV, criando uma bolsa para aplicação do selante e, posteriormente, avaliando seu efeito profilático na cicatriz.^{4,7} Neste estudo, a lesão criada afetou toda a região anteroposterior da PV, seguida de extenso descolamento da mucosa e secção das bordas anterior e posterior da incisão. Na prática clínica, essa situação pode ocorrer durante a cirurgia de sulco vocal, cistos volumosos ou excisão do edema de Reinke e tem maior probabilidade de gerar grandes cicatrizes, o que compromete a vibração das PVs, gerando resultados vocais ruins.

Nos casos que requerem uma manipulação cirúrgica maior das PVs, as camadas das PVs devem ser colocadas próximas à posição natural, sem espaços mortos, para permitir a cicatrização. Várias opções de minimização de cicatrizes foram avaliadas para melhores resultados vocais. A CF é amplamente usada clinicamente em outras especialidades e tem sido aplicada em cirurgias laringeas com grandes alterações anatômicas. No entanto, existem poucas evidências científicas que justifiquem o seu uso extensivo e o alto custo. Uma revisão sistemática recente avaliou o efeito da CF na cicatrização de anastomoses gastrointestinais e sete estudos encontraram efeitos positivos, enquanto oito estudos encontraram efeitos adversos.¹⁶ Os benefícios relatados incluíram melhoria das propriedades mecânicas do tecido, mas não melhoria da cicatrização.¹⁶ A melhoria das

propriedades mecânicas do tecido era esperada no presente estudo porque a CF proporciona melhor acomodação do tecido entre as camadas das pregas vocais; entretanto, esses resultados não foram corroborados por achados histológicos.

A coloração com HE foi usada para permitir a identificação do tecido, mostrando a localização precisa do epitélio da PV; a identificação da arquitetura celular e características do infiltrado inflamatório, indicando um processo inflamatório em estágio de remodelação. Uma vez percebidas essas estruturas, podemos aplicar os demais métodos de coloração para quantificação do colágeno, escopo do presente estudo.

O tricrômico de Masson é amplamente usado para visualizar a fibrose do tecido.¹⁷ A análise histológica indicou que as áreas de colágeno não foram significativamente mais abundantes nas PVs com CF, o que pode ser atribuído a limitações na análise quantitativa pela coloração tricrômica de Masson, uma vez que essa coloração apresenta maior dificuldade para os *softwares* de processamento de imagem disponíveis em distinguir entre o tecido saudável corado de vermelho e o tecido fibrótico corado de azul.¹⁷

Picrosirius red tem alta sensibilidade e especificidade para a detecção de colágeno;¹⁸ é amplamente usado em estudos de cicatrização de PVs,^{7,8,10} permitindo que a distribuição e a organização do colágeno sejam determinadas¹⁸ e ajudando a diferenciar entre os tipos de colágeno presentes em diferentes camadas por imuno-histoquímica.

Neste estudo, as PVs com CF apresentaram áreas significativamente maiores ocupadas por fibras de colágeno ($p < 0,05$), concordando com os resultados de Portes et al., nos quais a fibroplasia das pregas vocais foi significativamente maior nos tecidos com CF.⁷ Maunsell et al. observaram que a concentração de colágeno foi maior nas PVs com CF, sem significância estatística.¹¹ Além disso, Scapini et al. observaram aumento significativo na concentração de colágeno ao redor da fásia em PVs com CF 90 dias após o procedimento,⁸ o que está de acordo com o presente estudo.

Scapini et al. atribuíram esse resultado à maior expressão do fator de crescimento transformador Beta tipo-1 (*transforming growth factor* $\beta 1$ – TGF- $\beta 1$) na presença de FG.⁸ O TGF- $\beta 1$ é uma citocina que regula a cicatrização e desempenha um papel essencial na ativação dos fibroblastos, abundantes nas cicatrizes de pregas vocais.¹⁹ Saed et al. avaliaram possíveis alterações na expressão de TGF- $\beta 1$ ao aplicarem CF em células mesoteliais do peritônio humano e observaram que a expressão diminuiu, enquanto a concentração de colágeno tipo I e III aumentou, potencialmente reduzindo a chance de aderências em cirurgias abdominais.²⁰

Saed et al. avaliaram o efeito da CF Tisseel® (Baxter Healthcare Corp., Westlake Village, CA) na expressão de TGF- $\beta 1$ em diferentes combinações de componentes e observaram que a preparação sem aprotinina apresentou maior redução na expressão de TGF- $\beta 1$, o que poderia reduzir a fibrogênese.²⁰ Evicel® (Ethicon Inc., Somerville, NJ) não contém aprotinina e, portanto, pode ter uma expressão reduzida de TGF- $\beta 1$; no entanto, Saed et al. usaram tecido peritoneal, que não possui as mesmas características das pregas vocais. Outros estudos usaram Tissucol® (Baxter, Immuno AG, Viena, Áustria),^{7,8,11} que tem a mesma

composição do Tisseel® (Baxter Healthcare Corp., Westlake Village, CA), com resultados semelhantes aos do presente estudo, sugerindo que a diferença na composição da cola não contribuiu significativamente para a cicatrização das PVs.

Conclusão

As PVs com CF após o descolamento do enxerto pediculado mostraram área mais extensa ocupada por fibras de colágeno que as PVs de controle em coelhos. Portanto, no presente estudo, a cola induziu maior fibrogênese na prega vocal em fase tardia do processo de cicatrização.

Financiamento

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) financiaram esta pesquisa (Processo nº 2014/10767-0).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Este estudo foi realizado de acordo com a Lei Federal Brasileira (11.974/ 2008) e as diretrizes aprovadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Agradecimentos

A Manoel Messias da Silva, Doutor em Medicina do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pelo auxílio na interpretação histológica e a Valeria Vieira Ishida, Doutora em Medicina Veterinária, e sua equipe do Centro de Treinamento e Experimentação em Cirurgia do Hospital Einstein, pela assistência com os cuidados dos animais.

Referências

1. Hirano M. Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variations. *Folia Phoniatr (Basel)*. 1974;26:89–94.
2. Imamura R, Sennes LU, Tsuji DH. Fisiologia da Laringe. In: Campos CAH, Costa HOO, editors. *Tratado de Otorrinolaringologia*. São Paulo, SP: Roca; 2002. p. 751–67.
3. Bless DM, Welham NV. Characterization of vocal fold scar formation, prophylaxis, and treatment using animal models. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010;18:481–6.
4. Suehiro A, Bock JM, Hall JE, Garrett CG, Rousseau B. Feasibility, and acute healing of vocal fold microflap incisions in a rabbit model. *Laryngoscope*. 2012;122:600–5.
5. Garrett CG, Coleman JR, Reinisch L. Comparative histology and vibration of the vocal folds: implications for experimental studies in microlaryngeal surgery. *Laryngoscope*. 2000;110:814–24.
6. Spotnitz WD, Prabhu R. Fibrin sealant tissue adhesive—review and update. *J Long Term Eff Med Implants*. 2005;15:245–70.
7. Portes KP, Duprat AC, Lancellotti CLP, Silva L, Souza FC. Influência do selante de fibrina na cicatrização de pregas vocais de suíno. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2012;78:51–6.
8. Scapini F, Silva LF, Tsuji DH, Dolnikoff M, Sennes LU. Effect of fibrin glue on collagen deposition after autologous fascia grafting in rabbit vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2011;120:663–8.
9. Kirkwood BR, Stern JAC. *Essential medical statistics*. Massachusetts: Blackwell Science; 2006.
10. Rousseau B, Hirano S, Chan RW, Welham NV, Thibeault SL, Ford CN, et al. Characterization of chronic vocal fold scarring in a rabbit model. *J Voice*. 2004;18:116–24.
11. Maunsell RC, de Freitas LL, Altemani A, Crespo AN. Histologic comparison of vocal fold microflap healing with sutures and glue. *Laryngoscope*. 2013;123:1709–16.
12. Maytag AL, Robitaille MJ, Rieves AL, Madsen J, Smith BL, Jiang JJ. Use of the rabbit larynx in an excised larynx setup. *J Voice*. 2013;27:24–8.
13. Ge PJ, French LC, Ohno T, Zeale DL, Rousseau B. Model of evoked rabbit phonation. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2009;118:51–5.
14. Carneiro CG, Scapini F. O coelho como modelo de experimentação em laringologia. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2009;13:146–50.
15. Kwon SK, Ryu YJ, Kim DW, Chang H, Kim SY, Sung MW, et al. Prevention of anterior glottis web with hyaluronic acid derivatives in rabbit model. *Laryngoscope*. 2016;126:2320–4.
16. Nordentoft T, Pommergaard HC, Rosenberg J, Achiam MP. Fibrin glue does not improve healing of gastrointestinal anastomosis: a systematic review. *Eur Surg Res*. 2015;54:1–13.
17. Street JM, Souza AC, Alvarez-Prats A, Horino T, Hu X, Yuen OS, et al. Automated quantification of renal fibrosis with Sirius Red and polarization contrast microscopy. *Physiol Rep*. 2014;2:1–9.
18. Montes GS, Junqueira LCU. The use of the picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991;86:1–11.
19. Branski RC, Barbieri SS, Weksler BB, Saltman B, Krishna P, Kraus DH, et al. Effects of transforming growth factor beta1 on human vocal fold fibroblasts. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2009;118:218–26.
20. Saed GM, Kruger M, Diamond MP. Expression of transforming growth factor-β and extracellular matrix by human peritoneal mesothelial cells and by fibroblasts from normal peritoneum and adhesions: effect of Tisseel. *Wound Repair Regen*. 2004;12:557–64.