

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO CIRÚRGICA DE MATRIZES DE COLÁGENO NA PAREDE ABDOMINAL DE EQUÍNOS

VALCINIR ALOISIO SCALLA VULCANI,¹ DELPHIM DA GRAÇA MACORIS,² ANA MARIA DE GUZZI PLEPIS,³ VIRGÍNIA DA CONCEIÇÃO AMARO MARTINS⁴ E MAURO HENRIQUE LAPENA⁵

1. Médico-veterinário, mestre em Bioengenharia (USP – Interunidades), doutorando do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária – FCAV – UNESP de Jaboticabal. E-mail: aloisiosv@hotmail.com
2. Professor doutor do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária – FCAV – UNESP, Campus Jaboticabal
3. Professora doutora, Departamento de Química e Física Molecular, Grupo de Bioquímica e Biomateriais, Instituto de Química de São Carlos, USP, Campus São Carlos
4. Departamento de Química e Física Molecular, Grupo de Bioquímica e Biomateriais, Instituto de Química de São Carlos, USP, Campus São Carlos
5. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Materiais, nível Mestrado, UFSCar, Campus São Carlos

RESUMO

Nas últimas décadas têm surgido diferentes tipos de materiais, tanto naturais quanto sintéticos, para a reparação cirúrgica abdominal. Este trabalho teve como objetivo principal a obtenção de biomembranas a partir de centros tendinosos diafragmáticos submetidos a soluções alcalinas por diferentes períodos de tempo para posterior caracterização físico-química e utilização cirúrgica em eqüinos. Pretendeu-se analisar as alterações macro e microscópicas proporcionadas pelo tratamento em função da variável tempo, para a determinação do mais viável para utilização

como implante. Em segunda instância foram implantadas amostras obtidas por 72 horas de tratamento alcalino e liofilizadas, amostras submetidas em glicerina 98% e amostras apenas liofilizadas para controle. A retirada das amostras em uma, nove e dezoito semanas permitiram avaliar a diferença de integração na interface biomaterial/tecido, sendo que as amostras do meio alcalino demonstram menor dificuldade de dissecação em relação às amostras mantidas em glicerina e ao grupo-controle.

PALAVRAS-CHAVES: Biomateriais, colágeno, eqüinos, parede abdominal, reparação.

ABSTRACT

ATTAINMENT, CHARACTERIZATION AND SURGICAL APPLICATION OF COLLAGEN MATRICES IN EQUINE ABDOMINAL WALL

Different materials types, natural and synthetic have appeared for the abdominal surgical repairing. This work had as main objective to get biomembranes from diaphragmatic tendinous centers submitted to alkaline solutions for different periods of time for posterior physico-chemistry characterization and surgical use in equines. It was intended to analyze the macro and microscopical alterations caused for the treatment in function of the time variable, to be able to determinate the most viable for im-

plant use. In second instance samples gotten for 72 hours of alkaline treatment and liofilized, samples submitted in glycerin 98% and samples only liofilized for control had been implanted. The explantation of the samples in 1, 9 and 18 weeks had allowed to evaluate the difference of integration of the biomaterial/tissue interface. The samples of the alkaline way demonstrate to minor difficulty of dissection compared to the samples kept in glycerin and to the control group.

KEY WORDS: Abdominal wall, biomaterials, collagen, equines, repairing.

INTRODUÇÃO

A reparação cirúrgica ou reforço dos tecidos que compõe a parede da cavidade abdominal é uma das necessidades mais convencionais da cirurgia humana e veterinária. Especificamente para utilização em animais domésticos, o maior desafio é o desenvolvimento de biomateriais que suportem forças exercidas pelas vísceras, em virtude da posição quadrupedal destes animais, e pela movimentação das estruturas após o procedimento cirúrgico.

Em relação aos materiais utilizados nos tecidos da parede abdominal, BAERG et al. (2003) referem que a partir de 1950 tornou-se comum o uso das próteses sintéticas não absorvíveis como *nylon*, politetrafluoroetileno, silicone, poliéster, polipropileno, esponja de polivinil, fibras de carbono e das próteses sintéticas absorvíveis feitas de poliglactina 910 e de ácido poliglicólico (BELLÓN, 2005).

Mais recentemente, materiais colagênicos têm sido obtidos de várias espécies animais, o que requer diferentes técnicas de conservação para preservar sua viabilidade e diminuir sua antigenicidade.

A preservação tem sido feita por congelamento ou por agentes químicos, como as soluções mercuriais, ácido acético glacial, ácido peracético e glicerina (RAISER et al., 2001).

A glicerina a 98% foi amplamente utilizada para conservar diferentes tecidos nas últimas três décadas, como dura-máter (PIGOSSI et al., 1964), peritônio de bovino, peritônio de cão (DALECK et al., 1992), pericárdio de equino (RANZANI et al., 1990), diafragma de cães (MAZZANTI et al., 2000), bexiga de cão (OLIVEIRA et al., 2000) entre outros. A glicerina 98% mantém a vitalidade celular (LEITE et al., 1979) e seu modo de ação que está baseada na desidratação das células (PIGOSSI, 1964), à qual se atribui ação anti-séptica, atuando contra fungos e bactérias gram-negativas e gram-positivas, com exceção para as formas esporuladas (PIGOSSI, 1967).

Além da glicerina, verificou-se também a eficácia da solução alcoólica de tintura de timer-sol 1:1000 (ALVARENGA, 1992); polivinilpir-

rolidona (NETO et al., 2000); solução hipersaturada de sacarose (NETO et al., 1997), mel não processado (AMENDOLA, 2000) e solução hipersaturada de cloreto de sódio como alternativas de baixo custo (BRUN et al., 2002).

Porém, modificações químicas em alguns tecidos animais constituem-se em alternativas de elevado potencial para melhorar ou modificar as propriedades do colágeno neles contidos, sejam elas mecânicas, estruturais ou físico-químicas. Matrizes colagênicas com superfícies carregadas podem ser produzidas por reações químicas como de esterificação e succinilação (JAYAKRISHNAM & JAMELA, 1996).

GOISSIS et al. (1999) utilizaram solução alcalina em tecidos animais, o que reduziu a imunogenicidade, em virtude da hidrólise dos grupos carboxiamidas (Figura 1), e otimizou as propriedades piezoelétricas do colágeno, atuando como um estimulador físico-químico de crescimento celular. Essa modificação conduz a um aumento total de até 106 cargas negativas por unidade de tropocolágeno após tratamento alcalino (BET et al., 2001). Porém, caracterizações físico-químicas por espectroscopia na região do infravermelho sugeriram que a estrutura em hélice tripla do tropocolágeno foi preservada durante a hidrólise (GOISSIS et al., 1999). PARREIRA (2004) utilizou o processo de hidrólise alcalina em pericárdio bovino em amostras tratadas por 24 e 48 horas e as implantou no subcutâneo de ratos, observando o comportamento de integração tissular até 180 dias. Essas matrizes tiveram significativa diferença, em relação ao grupo-controle, na redução de fibrosamento e ausência de resposta inflamatória crônica.

VULCANI et al. (2006) utilizaram centro tendinoso diafragmático tratado em solução alcalina por 72 horas e liofilizado, obtendo biomembrana de quinze centímetros de comprimento e aproximadamente nove centímetros de largura. Após esterilizada em óxido de etileno, aplicou-se cirurgicamente em égua com hérnia umbilical recidivante, em virtude de pouco tecido disponível para fechamento das bordas cirúrgicas. Não houve rejeição do material e nem alterações dos parâmetros clínicos observados. O implante fora

avaliado por ultra-sonografia, no qual se observou que não havia aderência da biomembrana e a

motilidade intestinal estava normal. Nenhuma alteração digna de nota foi descrita pelo avaliador.

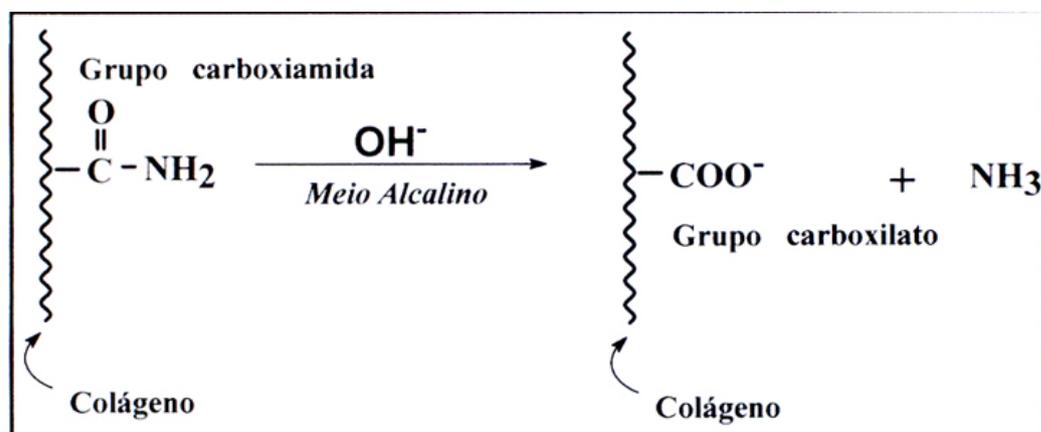


FIGURA 1. Ilustração esquemática da hidrólise dos resíduos de glutamina e asparagina presentes no colágeno em meio alcalino.

A partir da revisão dos resultados anteriormente obtidos, objetivou-se, no presente trabalho, processar biomembranas a partir de centros tendinosos diafragmáticos de eqüinos em solução alcalina, conforme descrito por GOISSIS et al. (1999), para posterior caracterização físico-química. Em segunda instância, pretendeu-se, por comparação com o método de conservação em glicerina 98 %, verificar a viabilidade de utilização cirúrgica, bem como as características do material na interface tecido/biomaterial.

MATERIAL E MÉTODOS

Os centros tendinosos diafragmáticos foram obtidos de eqüinos que vieram a óbito por causa conhecida, com exclusão das infecto-contagiosas, e de animais submetidos à eutanásia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, UNESP.

Após a remoção, imergiram-se os centros tendinosos diafragmáticos em solução fisiológica a 0,9 % para a retirada de resíduos sanguíneos.

Posteriormente, tratou-se o material em solução poliônica alcalina, pH 13, contendo dimetilsulfóxido, cloretos e sulfatos de sódio, potássio e cálcio, preparada em água destilada. Após 24, 48, 72, 120 e 144 horas de imersão, os sais

residuais foram removidos por três lavagens sucessivas com H₃BO₃ 3% e EDTA 3%, congeladas gradativamente sob temperatura de 15°C por doze horas e -15°C por doze horas e liofilizadas, segundo a metodologia proposta por GOISSIS (1999).

Produziram-se amostras retiradas em diferentes tempos de tratamento, a fim de se verificar possíveis alterações morfológicas após tratamento alcalino do colágeno e decidir qual seria mais adequada à utilização *in vivo*. Para essa finalidade, levaram-se em consideração os seguintes aspectos: viabilidade para sutura, manutenção de resistência mecânica à sutura e homogeneidade.

Caracterização físico-química

As amostras obtidas e o material *in natura* foram caracterizados por calorimetria exploratória diferencial, utilizando-se aproximadamente 10 mg (10°C/min sob fluxo de O₂ com intervalo de temperatura de 25 a 150°C), e por microscopia eletrônica de varredura, recobrimo-as com uma camada de ouro de 20 nm e aplicando feixe de elétrons entre 10 e 20 keV.

Realizou-se ensaio de degradação enzimática com collagenase de origem bacteriana (Sigma tipo V - 435 unidades mg⁻¹), cuja solução foi preparada com tampão tris-HCl 100mmol L⁻¹, pH

7,4, contendo 25 mmol L⁻¹ de cloreto de cálcio. A solução final utilizada continha a concentração de enzima de 20UI/mL.

Utilizaram-se as amostras obtidas nos tempos de 48, 96 e 144 horas de tratamento alcalino e material não-tratado. A quantidade de solução colocada nas amostras foi baseada no intuito de obter 20UI de enzima por miligrama de colágeno e submetida em estufa a 37°C durante três horas.

Implantação cirúrgica

Para o procedimento realizou-se a tranquilização dos animais com maleato de acepromazina (0,10mg.kg⁻¹ por via intravenosa), bem como a indução da anestesia com éter gliceril guaicol (50mg.Kg⁻¹) associado a tiopental sódico (1g.200Kg⁻¹ por via intravenosa), além da manutenção desta por via inalatória com halotano, vaporizado em oxigênio a 100 % em circuito semifechado.

Após tricotomia e anti-sepsia, foram feitas três incisões cutâneas paramedianas, divulsão do subcutâneo, afastamento das fibras do músculo reto abdominal, exposição da fáscia interna do músculo reto do abdome e retirada de três fragmentos (2x3cm) desta, para a fixação de uma amostra (2x3cm) de cada grupo, mediante sutura-padrão contínuo simples com fio poliglactina 910 nº0 (Figura 2A). Suturaram-se a fáscia externa em padrão contínuo simples e a pele em padrão colchoeiro horizontal contínuo, ambas com fio monofilamentar de poliamida 2-0. No período pós-cirúrgico imediato, os animais receberam penicilina procaína (22.000 UI.kg⁻¹) por via intramuscular a cada 24 horas, durante três dias consecutivos.

Em cada animal, foram feitos, portanto, três blocos cirúrgicos constituídos por amostras dos três grupos, em posição alternada, de forma a minimizar o erro experimental, totalizando nove amostras por animal. Submeteram-se as amostras do grupo glicerina à solução de antibiótico durante quinze minutos, sendo lavadas, em seguida, com solução fisiológica 0,9%, antes da implantação (Figura 2B).

Nas primeiras doze horas pós-cirúrgicas, os animais permaneceram em baia e receberam feno

e água à vontade. Decorrido esse período, foram colocados em piquetes, recebendo água à vontade, feno e ração. Em virtude da possível contaminação da ferida cirúrgica durante a estada nos piquetes, realizou-se diariamente a limpeza da ferida cirúrgica com líquido de Dakin, aplicação de tintura de iodo a 2 % e aplicação de repelente ao redor da ferida, durante oito dias consecutivos, quando se removeram as suturas de pele.

A retirada dos implantes foi feita após uma, nove e dezoito semanas, quando se avaliou, durante o ato cirúrgico, a ocorrência de aderência tecidual sobre o implante, segundo a classificação da Tabela 1.

Após as intervenções cirúrgicas, avaliaram-se os animais clinicamente, a fim de se verificar o estado de saúde deles e prevenir complicações, considerando-se os seguintes parâmetros: frequências cardíaca e respiratória, tempo de preenchimento capilar, temperatura retal, avaliação de mucosas e condições de cicatrização da ferida cirúrgica.

TABELA 1. Qualificação da aderência tecidual sobre o implante, em relação à dificuldade de sua liberação dos tecidos adjacentes (adaptado de SUZIGAN et al., 2001)

Classificação	Aderência	Liberação do implante
+	Mínima	Dissecação romba suave
++	Moderada	Dissecação romba agressiva
+++	Máxima	Não liberada por dissecação romba

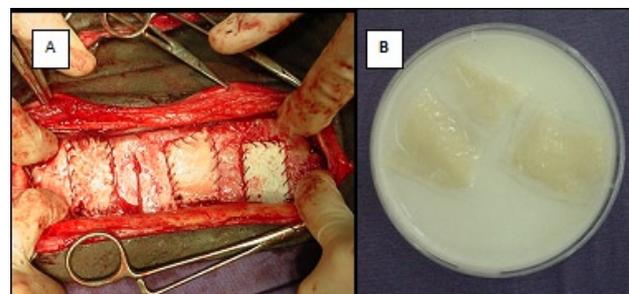


FIGURA 2. Aspecto das amostras recém-implantadas na fáscia interna do músculo reto abdominal (A). Amostras do Tratamento 2 submetidas à solução de antibiótico quinze minutos antes da implantação (B).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliando-se macroscopicamente as amostras tratadas em solução alcalina em diferentes períodos de tempo, notou-se que o tratamento por 72 horas deixou as amostras com aspecto mais homogêneo em relação aos menores tempos de tratamento. Já os tratamentos em maiores tempos diminuíram a resistência à sutura das amostras, o que levou a optar pela implantação das amostras tratadas neste período.

Análise térmica

A análise calorimétrica por calorimetria exploratória diferencial (CED) permite a medida de estabilidade das estruturas helicoidais das moléculas de colágeno, relativas à transição colágeno→gelatina. A quebra da estrutura da hélice tripla dá lugar a uma estrutura amorfa formada por cadeias polipeptídicas: $\alpha 3$ (hélice tripla) → cadeias α, β e γ de polipeptídicos (gelatina). Essa transição aparece como uma descontinuidade na linha de base, que é proporcional à diferença na capacidade de calor antes e após a desnaturação.

A análise das curvas de CED (Figura 3) permitiu a obtenção da temperatura de desnaturação, que se deu por volta de 54°C , das amostras, comprovando-se, assim, que o colágeno presente no centro tendinoso diafragmático não foi desnaturado durante o tratamento alcalino.

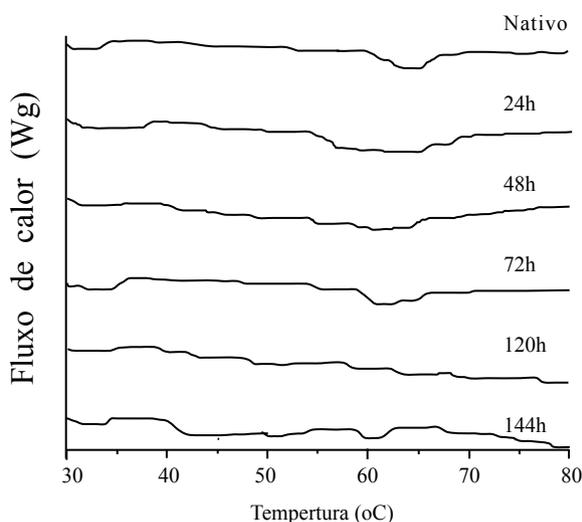


FIGURA 3. Curvas CED do material *in natura* e das matrizes colagênicas após tratamento alcalino até 144 horas.

As fotomicrografias (Figura 4) mostram que a matriz tem um aspecto irregular, com zonas bastante densas e outras menos densas, mostrando a presença de arranjos de fibras randomicamente dispostos, mas compactos em alguns pontos. Após tratamento alcalino (48 horas), observa-se uma expansão das zonas menos densas. A observação macroscópica das amostras para escolha do tempo de tratamento a ser adotado foi reforçada pelos achados na microscopia eletrônica de varredura, pois ficou evidente que o material tratado em solução alcalina por períodos superiores a 72 horas tornou-se mais irregular, alterando características como a resistência.

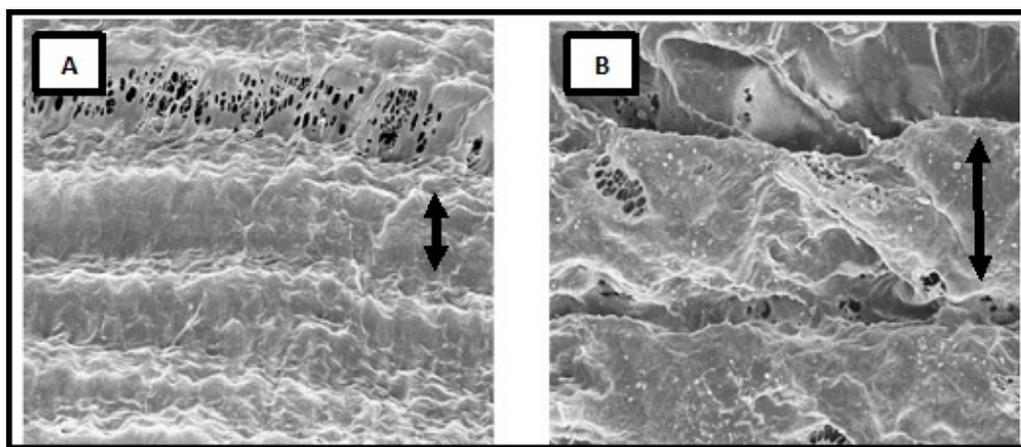


FIGURA 4. Fotomicrografias das amostras de centro tendinoso diafragmático equino. Em (A) material *in natura* (não tratado em solução alcalina). Em (B) material tratado em solução alcalina por 48 horas. Observa-se a dimensão das zonas menos densas do material, em virtude do tratamento em solução alcalina (vetores de sentido duplo). Aumento de 500 vezes.

Essas alterações se deram pela modificação da disposição das fibras de colágeno e não pela modificação da molécula de tropocolágeno, como evidenciaram as curvas de calorimetria exploratória diferencial, mostrando que não houve desnaturação protéica.

Ensaio de degradação enzimática

Obtiveram-se os valores de degradação, que variaram de 18,3% para o material nativo, a 38,8%, para o material tratado, conforme a Tabela 2.

TABELA 2. Degradação do centro tendinoso diafragmático *in natura* e das amostras obtidas após o tratamento alcalino até 144 horas em solução de colagenase durante três horas.

Amostras	Degradação (%)
<i>In natura</i>	18,3 ± 1,4
48 h	12,6 ± 1,9
96 h	32,5 ± 10,0
144 h	38,8 ± 3,5

Avaliação cirúrgica

Os resultados da classificação do nível de dificuldade de retirada por dissecação das amostras estão expostos na Tabela 3.

Observou-se que as amostras tratadas em solução alcalina foram liberadas dos tecidos com maior facilidade em relação ao grupo-controle e ao grupo tratado em glicerina a 98 %. Retiraram-se amostras do tecido de cicatrização somente após dezoito semanas, uma vez que os fragmentos haviam sido degradados, não sendo possível classificar segundo o critério proposto. Em relação aos parâmetros clínicos dos animais receptores, não se notou nenhuma alteração digna de nota.

Os resultados obtidos na explantação das amostras mostraram que o tratamento influenciou na integração tecido-biomaterial. Houve maior facilidade na remoção das amostras tratadas em solução alcalina, provavelmente graças à capacidade do tratamento em remover resíduos teciduais e alterar grupos carboxiamidas das moléculas de colágeno (GOISSIS et al., 1999), que

são responsáveis por ocasionar respostas nos organismos hospedeiros.

TABELA 3. Variação do nível de dificuldade de retirada dos implantes

Animal	Uma semana			Nove semanas		
	GC	TG	TA	CG	TG	TA
1	+++	++	+	+++	++	+
2	+++	++	+	+++	+++	++
3	+++	++	+	+++	++	+
4	+++	+	+	+++	++	++
5	+++	++	+	+++	+++	+
6	+++	++	+	+++	++	+

+ Aderência mínima – liberação por dissecação romba suave

++ Aderência moderada – liberação por dissecação romba agressiva

+++ Aderência máxima – não liberada por dissecação romba

CONCLUSÕES

Verificou-se que o tempo de tratamento não influenciou na desnaturação protéica da estrutura do colágeno, porém modificou a disposição de fibras do material. Dos tempos de tratamento propostos, o tratamento alcalino por 72 horas se mostrou como um intermediário entre as características de resistência à sutura e homogeneidade das amostras.

A integração dos materiais implantados, com os tecidos adjacentes a eles, se deu de forma mais amena no tratamento por solução alcalina durante 72 horas, quando comparado com o grupo-controle e com o grupo tratado em glicerina.

AGRADECIMENTOS

À Fapesp, pelo suporte financeiro ao projeto, sob protocolo número 2005/00226-2; ao Laboratório de Bioquímica e Biomateriais (IQSC – USP Campus São Carlos) e à Empresa Oxetil®, pela esterilização das amostras em óxido de etileno.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DA-

- LECK, C.R. **Tópicos em cirurgia de cães e gatos**. Jaboticabal: FUNEP-UNESP, 1992. p. 33-42.
- AMENDOLA, G.F.; SCHOSSLER, J.E.W.; OLIVEIRA, S.T. et al. Traqueoplastia em coelhos com centro frênico canino conservado em mel. **Ciência Animal Brasileira**, v.1, suplemento, p.111, 2000.
- BAERG, J.; KABAN, G.; TONITA, J.; PAHWA, P.; REID, D. Gastroschisis: a sixteen-year review. **Journal of Pediatric Surgery**, New York, v. 38, n. 5, p.771-774, 2003.
- BÉLLON, J. M. Propuesta de una nueva clasificación de prótesis destinadas a la reparación de defectos herniarios en la pared abdominal. **Cirúrgica Española**, v. 78, n.3, p.148-151, 2005.
- BET, MR; GOISSIS, G.; LACERDA, C. A. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxamide side chains. **Biomacromolecules**, v. 2, p.1074-1079, 2001.
- BRUN, M.V.; PIPPI, N. L.; DREIMEIER, D.; CONTESINI, E. A.; CASTRO BECK, C.A.; CUNHA, O.; PINTO FILHO, S.T.L.; ROEHSIG, C.; STEDILE, R. Solução hipersaturada de sal como conservante de pericárdio canino utilizado na reparação do músculo reto abdominal de ratos Wistar. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p.1019-1025, 2002.
- DALECK, C.R.; PADILHA FILHO, J.G.; COSTA NETO, J. M. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, v. 22, n. 2, p.179-183, 1992.
- GOISSIS, G.; LACERDA, C.; BARBOSA, M.P.; PINATTI, A. Surface tension controll of collagen biomaterials by the selective hydrolysis of internal carboxyamides of the protein matrix. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v.15, p. 55-61, 1999.
- JAYAKRISHNAM, A.; JAMELA, S.R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprosthesis and drug delivery matrices. **Biomaterials**, v. 17, p. 471-484, 1996.
- LEITE, J.B.F. A glicerina e a preservação dos tecidos. **Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, v. 93, p.81-84, 1979.
- MAZZANTI, A.; PIPPI, N.L.; RAISER, A.G.; GRAÇA, D.L.; SILVEIRA, A.F.; STEDILE, R.; BRAGA, F.V.A.; RICHIES, M. Reparação da traquéia de cão com segmento muscular homólogo de diafragma conservado em glicerina a 98%. **Ciência Rural**, v. 30, n. 6, p.1011-1016, 2000.
- COSTA NETO, A. A.; PAES, J. L. L.; CARVALHO, R. G. Concentração bactericida do açúcar em culturas de *Escherichia coli*. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 24, n. 3, p. 151-154, 1997.
- NETO, J. M. C.; DALECK, C. R.; VICENTE, F. A. M.; ARAÚJO JR., P.; ALESSI, A.C.; FANTINATTI, A.P.; CAVALCANTE DE SÁ, M.J. Ação antimicrobiana da glicerina a 98% e da solução aquosa de iodo povidona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 4., 2000. Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia: CBCA, 2000b. p. 97.
- OLIVEIRA, L.O. et al. Implante homogêneo de bexiga conservada em glicerina a 98% para reparo da bexiga de cães. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 27, n. 1, p. 90-102, 2000.
- PAULO, N. M.; DE LIMA, F. G.; SIQUEIRA JUNIOR, J. T. de; FLEURY, L. F. F.; DE SANT'ANA, F. J. F. de; BORGES, A. C.; DA COSTA, T.T. Membrana de látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), com e sem polilisina a 0,1% e tela de marlex na reconstrução de defeitos iatrogênicos da parede abdominal de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 305-310, 2005.
- PARREIRA, D. R. **Matrizes tridimensionais de colágeno anônico: elastina como suporte para reconstrução de tecidos moles – um estudo de integração matriz:tecido**. 2004. 56 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- PIGOSSI, N. **A glicerina na conservação de dura-máter: estudo experimental**. 1967. 36 f. Tese (Livre docência) – Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1967.
- PIGOSSI, N. **Implantação de dura-máter homogênea conservada em glicerina: estudo experimental em cães**. 1964. 41 f. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo, 1964.
- RAISER, A.G.; GRAÇA, D.L.; PIPPI, N.L.; ZINN, L.L.; SILVEIRA, D.S.; BORDIN, A.I.; BAIOTTO, G.C.; RIOS, M.V.; SILVEIRA, A.F. Homoiplante ortotópico de tendão calcâneo em cães. Conservação assepsia e implantação. **Ciência Rural**, v. 31, n. 1, p. 89-94, 2001.
- RANZANI, J. J. T.; GANDOLFI, W.; FRANCO, M.; CASTRO, G.B.; NICOLETTI, J.L.M. Implante de pericárdio de equino em glicerina em solução de continuidade do diafragma de cão. **Brazilian of Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 27, n. 1, p. 65-73, 1990.

SUZIGAN, S.; GOISSIS, G.; RODRIGUES PARREIRA, D.; CHAVES, H.; HUSSAIN, K. K.; RAYMUNDO, S.R.O. Anomalous metaplastic ossification of anionic collagen coated polypropylene mesh after implantation in the abdominal wall. In: CONGRESO VIRTUAL HISPANO AMERICANO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA, 4., Disponível em: <http://conganat.uniovi.es/posters/120/texto.htm>. Acesso em: 1º set. 2001.

VULCANI, V. A. S.; PLEPIS, A. M. de G.; CATTELAN, J. W.; MACORIS, D. da G. Aplicação de biomembrana para reparação cirúrgica de hérnia incisional em égua submetida à laparotomia mediana In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 7., 2006, Santos. **Anais ...** Santos, 2006.

Protocolado em: 18 jun. 2007. Aceito em: 25 mar. 2008.