

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS BOVINAS CONSERVADAS EM GLICERINA E A FRESCO

HISTOLOGICAL EVALUATION OF FRESH AND GLYCERIN PRESERVED BOVINE BIOLOGICAL MEMBRANES

Gregório Corrêa GUIMARÃES¹; Alessandra Regina Freixo SCAVONE²; Márcia Rita Fernandes MACHADO³; Claudinei da CRUZ⁴; Aretuza Carregari CAPALBO⁴; André Luiz Quagliatto SANTOS⁵

1. Doutorando em Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – FCAV, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, SP. gregorio@fcav.unesp.br; 2. Graduando em Medicina Veterinária, FCAVUNESP; 3. Professora. Adjunto da FCAV/UNESP; 4. Setor de Técnicas Morfológicas/Laboratório de Anatomia da FCAV/UNESP; 5. Professor Titular, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

RESUMO: Membranas biológicas são utilizadas em procedimentos cirúrgicos para fornecer um arcabouço e orientar o desenvolvimento de novos tecidos, mediante processos de reparação, que restabeleçam a estrutura e a função dos tecidos lesados. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar as características histológicas do centro tendíneo, da dura-máter, da fásia lata, do pericárdio, do peritônio e da túnica vaginal de bovinos conservados em glicerina a 98% por período de 15, 30, 60 e 90 dias e a fresco. Para tanto, coletou-se fragmentos dessas membranas de dez bovinos mestiços, machos, com idade entre 30 e 36 meses, empregando-se técnicas de microscopia de luz convencionais. Não se observou diferenças marcantes quanto à integridade morfológica e estrutural dos elementos que constituem tanto as amostras do material a fresco quanto àqueles conservados em glicerina a 98%, que exibiram células mesoteliais e fibras conjuntivas sem alterações marcantes. Notou-se também o esmaecimento na coloração geral e maior evidência dos núcleos nas membranas conservadas em glicerina. Conclui-se que a glicerina é eficaz para conservação de membranas biológicas.

PALAVRAS-CHAVE: Membranas biológicas. Histologia. Glicerina. Bovinos.

INTRODUÇÃO

A utilização de membranas biológicas como material de implante, para a reparação de órgãos e tecidos, já vem sendo praticada no Brasil desde a década de sessenta, com o trabalho pioneiro de Pigossi (1967), que utilizou dura-máter homogênea em cães, conservada em glicerina. O emprego de membranas biológicas deve-se, principalmente, à facilidade em sua obtenção, baixo custo, preparo simples, esterilização viável, facilidade na estocagem, pouca e/ou nenhuma reação tecidual (ALVARENGA, 1992).

Grande parte dos trabalhos envolvendo membranas biológicas busca avaliar sua viabilidade em procedimentos cirúrgicos nas diferentes regiões do organismo animal (ALVARENGA, 1992; COSTA NETO et al. 1999; DALECK et al. 1987; DALECK et al. 1988; DALECK et al. 1992; PIGOSSI et al. 1971; RODASKI et al. 2002). Suas funções principais são fornecer arcabouço para a orientação e para o desenvolvimento de novos tecidos, mediante processos de reparação, que restabeleçam a estrutura e a função do órgão afetado (BATISTA et al. 1996).

Dentre as membranas biológicas estudadas, destacam-se o centro tendíneo, a dura-máter, a

fásia lata, o pericárdio e o peritônio que possuem como característica principal, constituição quase que exclusivamente de colágeno (ALVARENGA, 1992). Para não estimularem reação imunológica, estas membranas devem permanecer preservadas por um período mínimo de 30 dias em glicerina (COSTA NETO et al. 1999; DALECK et al. 1992; SARTORI FILHO et al. 1997). Segundo Pigossi (1967), estas membranas podem ser conservadas por um período de até seis meses, ou mais, naquele mesmo meio.

Os meios de preservação utilizados para manter as membranas biológicas devem possuir alto poder estabilizador, impedindo a total decomposição dos tecidos e o crescimento de microorganismos além de preservar ao máximo, a integridade celular, aumentar a resistência à tração dos tecidos e atuar por um período de tempo prolongado (ALVARENGA, 1992; MOTA et al. 2002). Os mais comumente utilizados são: glicerina a 98%, solução alcoólica de tiomersal (1:1000), congelamento, álcool absoluto, vaselina, glutaraldeído, solução supersaturada de açúcar a 300% e polivinil pirrolidona a 5%, entre outros (ALVARENGA, 1992; MOTA et al. 2002; NOLASCO et al. 2003; REYES, 1993).

O meio de conservação mais utilizado para essas membranas é a glicerina a 98%, mantida em temperatura ambiente. Ela apresenta como vantagens baixo custo e propriedade antisséptica (ALVARENGA, 1992), além de reduzir a antigenicidade, preservar a textura do tecido e aumentar a resistência à tração, sem alterar o grau de elasticidade (PIGOSSI, 1967). Vários autores utilizaram-na para preservar tecidos (ALVARENGA, 1992; BATISTA et al. 1996; DALECK et al. 1987; MOTA et al. 2002; NOLASCO et al. 2003; PIGOSSI, 1967; REYES, 1993).

Algumas membranas biológicas de bovinos têm sido utilizadas em estudos experimentais, apresentando resultados satisfatórios. Em cães, empregou-se dura-máter conservada em glicerina por período maior que seis meses, na reparação da bainha do músculo reto do abdome (INATOMI et al. 1980); peritônio na substituição de retalho diafragmático (DALECK et al. 1988), na reparação de hérnia perineal (DALECK et al. 1992) e na tenoplastia do tendão calcâneo comum (COSTA NETO et al. 1999) e pericárdio na artroplastia acetábulo-femoral (RODASKI et al. 2002).

A avaliação de alterações na estrutura e sustentação dos tecidos é de grande importância e alguns estudos foram realizados a partir da análise histológica das membranas biológicas conservadas em diferentes meios (DALECK et al. 1987; DALECK et al. 1988; DALECK et al. 1992; MOTA et al. 2002; NOLASCO et al. 2003).

Assim, objetivou-se neste estudo, analisar as características morfológicas histológicas de seis membranas de bovinos, tanto a fresco quanto conservadas em glicerina a 98%.

MATERIAL E MÉTODOS

Avaliaram-se neste estudo seis membranas biológicas (centro tendíneo, dura-máter, fásia lata, pericárdio, peritônio e túnica vaginal) provenientes de dez bovinos machos, mestiços, com idade entre 30 e 36 meses, colhidas após abate, no Frigorífico Barra Mansa Comércio de Carnes e Derivados Ltda., Sertãozinho - SP. Retirou-se em cada animal uma amostra das membranas estudadas e destas cinco fragmentos.

Todo material coletado foi devidamente lavado em água corrente para retirada de resíduos e, em seguida, as amostras de cada membrana, consideradas como grupo controle, foram fixadas

em solução de Bouin e encaminhadas ao Setor de Técnicas Morfológicas do Laboratório de Anatomia da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para processamento e análise.

As demais amostras foram imersas em recipientes contendo glicerina a 98% e de cada uma delas, foram retirados fragmentos que foram processados para a análise histológica nos dias 15, 30, 60 e 90 pós-coleta. Durante esse período, o material foi acondicionado em frascos com a proporção "glicerina/membrana" de 20:1 e mantidos à temperatura ambiente.

Os tecidos conservados em glicerina, foram reidratados por 20 minutos antes de entrarem na rotina histológica, simulando condições a que são submetidos nos períodos pré e trans-operatório.

Fixou-se o material em solução de Bouin por 24 horas. Após esse período, lavou-se o mesmo em álcool a 70% para retirada do excesso de fixador. Em seguida, os fragmentos foram submetidos à desidratação em concentrações crescentes de álcool (70 a 100%) durante quatro horas. A seguir, realizou-se a diafanização com xilol por aproximadamente 90 minutos e após este procedimento, efetuou-se a inclusão do material em Histosec[®] por 90 minutos, em temperatura entre 60 e 70°C.

A microtomia do material foi realizada em micrótomo automático (Leica, RM 2155), obtendo-se cortes de 5 µm com auxílio de navalhas descartáveis que foram submetidos à coloração de hematoxilina e eosina (HE) de acordo com as técnicas descritas por Freitas Neto et al. (2003). Algumas preparações foram fotodocumentadas em microscópio de luz BX-50 (Olympus[®]).

RESULTADOS

Todas as membranas analisadas, tanto nas amostras a fresco quanto nas conservadas em glicerina a 98% nos dias 15, 30, 60 e 90, apresentaram mesma constituição estrutural. Verificou-se, no caso do material conservado em glicerina, menor afinidade tintorial para eosina e maior para hematoxilina, além da retração das fibras colágenas.

No pericárdio constatou-se a presença de fina camada de células epiteliais (mesotélio) repousando sobre tecido conjuntivo denso não modelado com fibras pouco acidófilas dispostas longitudinalmente, bem próximas entre si e núcleos acentuadamente basófilos (Figura 1).

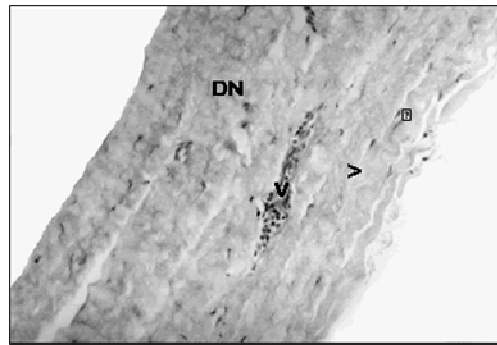


Figura 1. Fotomicrografia de uma amostra de pericárdio bovino a fresco (grupo controle), na qual se observa tecido conjuntivo denso não modelado (DN), fibras em disposição longitudinal (>); vaso sanguíneo (v); núcleos acentuadamente basófilos (◀). HE, 200X.

No atinente às amostras de pericárdio conservadas em glicerina a 98%, observou-se uma desorganização tecidual mais acentuada aos 15 dias

e em todos os períodos notou-se uma menor afinidade para a coloração à eosina, como mostrado aos 15 e 60 dias (Figuras 2A e 2B).

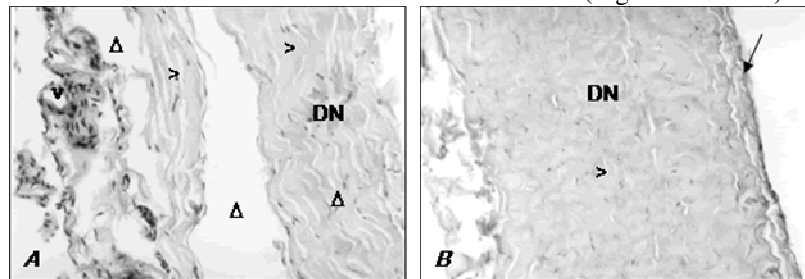


Figura 2. Fotomicrografias de amostras de pericárdio bovino conservado em glicerina a 98%. Em A aos 15 dias e em B aos 60 dias onde nota-se estrutura tecidual semelhante à da amostra controle, ou seja, mesotélio (seta); tecido conjuntivo denso não modelado (DN); fibras em disposição longitudinal (>); vaso sanguíneo (v). Notar a diferenciação na organização tecidual aos 15 dias (Δ). HE, 200X.

Com relação ao peritônio, observou-se presença de tecido conjuntivo denso modelado, cujas fibras mostraram-se acidófilas, dispostas longitudinalmente e justapostas, apresentando fibroblastos com núcleos levemente basófilos.

Compondo as extremidades desta serosa, nota-se a presença de uma camada de células mesoteliais apoiadas sobre delgada camada de tecido conjuntivo frouxo, rico em vasos sanguíneos (Figuras. 3A e 3B).

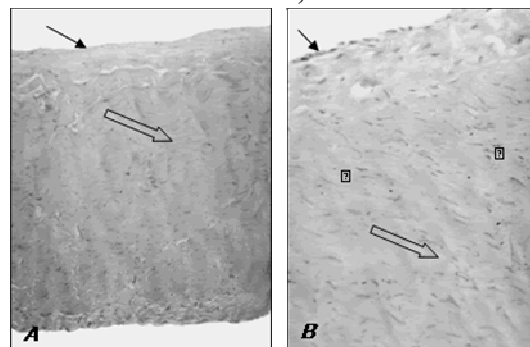


Figura 3. Fotomicrografias de amostras de peritônio bovino a fresco (grupo controle). Em A se observa tecido conjuntivo denso modelado (seta vasada), com fibras acidófilas, dispostas longitudinalmente, próximas entre si. HE, 100X. Em B verifica-se a presença de fibroblastos com núcleos levemente basófilos (▶◀). HE, 200X. Em A e B nota-se o mesotélio (seta) apoiado sobre tecido conjuntivo denso modelado.

As amostras de peritônio conservadas em glicerina a 98% exibiram uma desorganização tecidual mais acentuada aos 15 dias e em todos os

períodos pode-se notar uma menor afinidade para a coloração à eosina, como verificado aos 15 e 60 dias (Figuras 4A e 4B).

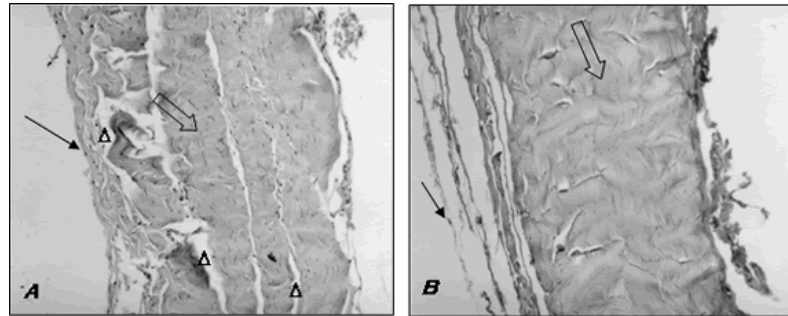


Figura 4. Fotomicrografias de amostras de peritônio bovino conservadas em glicerina a 98%. Em A aos 15 dias e em B aos 60 dias onde se observa estrutura tecidual semelhante à da amostra controle, ou seja, tecido conjuntivo denso modelado (seta vasada) com fibras próximas entre si sustentando o mesotélio (seta). Notar a diferenciação na organização tecidual aos 15 dias (Δ). HE, 100X.

Quanto à túnica vaginal, verificou-se que a mesma é composta por uma camada de células mesoteliais repousando sobre fibras de tecido conjuntivo denso não modelado que se mostram acidófilas, dispostas longitudinalmente, bem

próximas entre si, apresentando poucos fibroblastos, cujos núcleos mostram-se levemente basófilos. Verifica-se também a presença de alguns adipócitos e vasos sanguíneos entre as fibras de tecido conjuntivo (Figura 5).

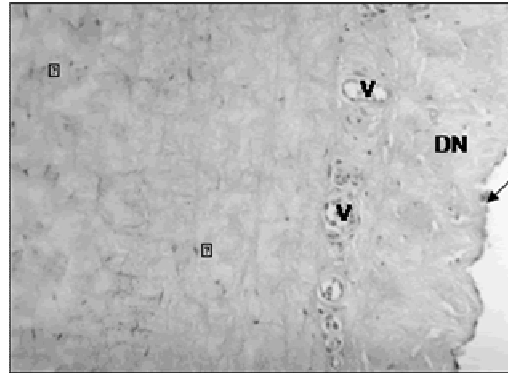


Figura 5. Fotomicrografia de uma amostra de túnica vaginal de bovino a fresco, onde se verifica o mesotélio (seta) apoiado sobre tecido conjuntivo denso não modelado (DN), núcleos de fibroblastos (\blacktriangle) e vasos sanguíneos (V). HE, 200X.

Nas amostras de túnica vaginal, conservadas em glicerina a 98%, observou-se uma desorganização tecidual mais acentuada aos 15 dias

e em todos os períodos notou-se uma menor afinidade para a coloração à eosina, como mostrado aos 15 e 60 dias (Figuras. 6A e 6B).

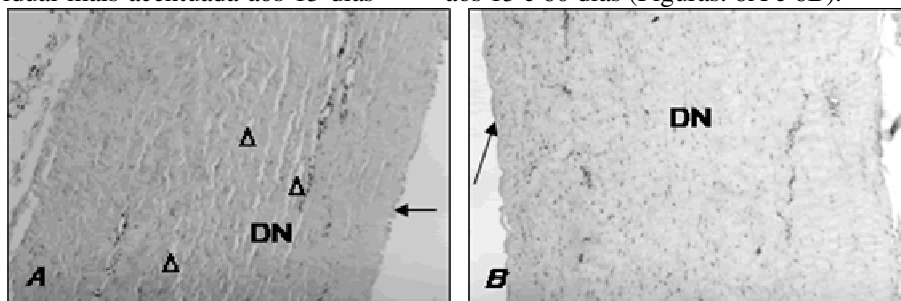


Figura 6. Fotomicrografias de amostras de túnica vaginal conservadas em glicerina a 98%. Em A aos 15 dias e em B aos 60 dias onde se observa o mesotélio (seta) apoiado sobre tecido conjuntivo denso não modelado (DN). Notar a diferenciação na organização tecidual aos 15 dias (Δ). HE, 100X.

Notou-se nas amostras de dura-máter, que a porção em contato com os ossos que delimitam a cavidade craniana compõe-se de tecido conjuntivo frouxo, adipócitos e veias de parede delgada. A

camada interna é formada por tecido conjuntivo denso não modelado, revestida por epitélio simples pavimentoso em sua porção voltada para a aracnóide (Figura 7).

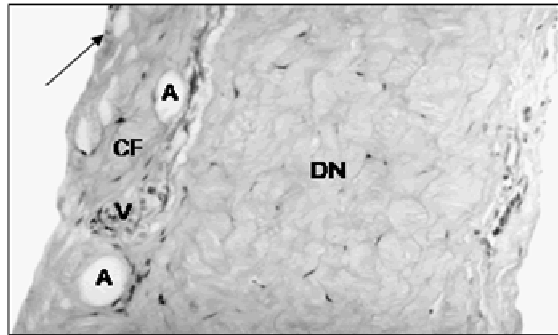


Figura 7. Fotomicrografia de uma amostra de dura-máter de bovino a fresco, onde se verifica a porção que está em contato com o periósteo composta de tecido conjuntivo frouxo (CF), adipócitos (A) e veias de parede delgada (V). Verifica-se ainda que a camada mais interna é formada por tecido conjuntivo denso não modelado (DN) revestido por mesotélio (seta). HE, 200X.

Nas amostras de dura-máter, conservadas em glicerina a 98%, observou-se uma desorganização tecidual mais acentuada aos 15 dias

e em todos os períodos notou-se uma menor afinidade para a coloração à eosina, como mostrado aos 15 e 60 dias (Figs. 8A e 8B).

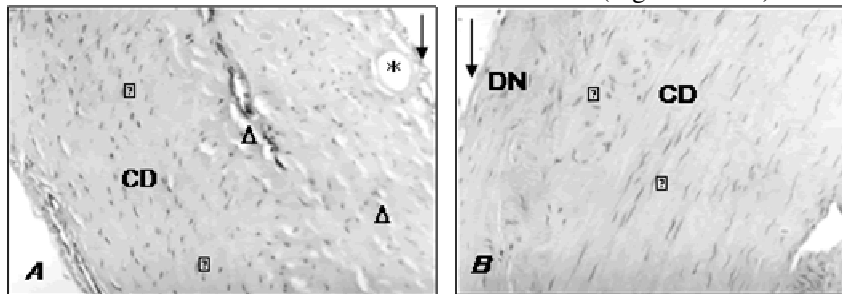


Figura 8. Fotomicrografias de amostras de dura-máter conservadas em glicerina a 98%. Em A aos 15 dias e em B aos 60 dias onde se verifica a porção em contato com o periósteo constituída por tecido conjuntivo denso não modelado (DN) associado a tecido conjuntivo denso modelado (CD) e revestido por mesotélio (seta). Notar a diferenciação na organização tecidual aos 15 dias (Δ) e melhor evidência dos núcleos (\blacktriangleleft) indicando maior reação à hematoxilina. Adipócito (*). HE, 200X.

Verificou-se nas amostras de fásia lata a fresco uma túnica adventícia em sua porção superficial, composta por tecido conjuntivo frouxo, sobreposto a tecido conjuntivo denso não modelado, constituído por fibras acidófilas dispostas

irregularmente com fibroblastos apresentando núcleos intensamente basófilos. Sua face profunda adere-se à camada muscular por meio de tecido conjuntivo frouxo, rico em células adiposas (Figura 9).

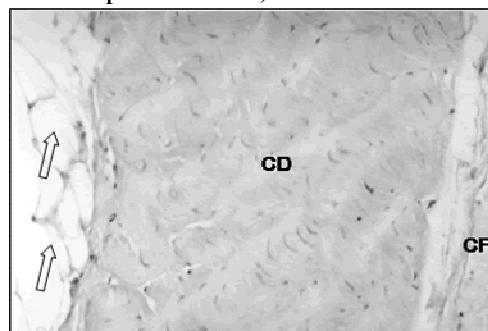


Figura 9. Fotomicrografia de uma amostra de fásia lata de bovino a fresco, notando-se camada constituída por tecido conjuntivo denso modelado (CD) envolvido por tecido conjuntivo frouxo (CF) além de adipócitos (seta vasada). HE, 200X.

Nas amostras de fásia lata conservadas em glicerina a 98%, observou-se uma desorganização tecidual mais acentuada aos 15 dias e em todos os

períodos, notou-se uma menor afinidade para a coloração à eosina, como evidenciado aos 15 e 60 dias (Figuras. 10A e 10B).

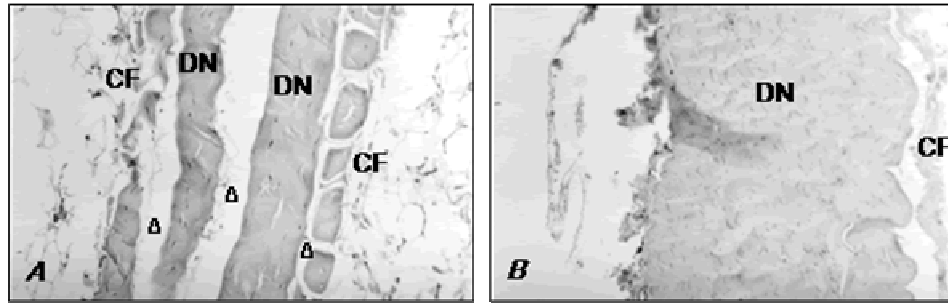


Figura 10. Fotomicrografias de amostras de fásia lata conservadas em glicerina a 98%. Em A aos 15 dias e em B aos 60 dias onde nota-se estrutura tecidual semelhante à da amostra controle, ou seja, constituída por tecido conjuntivo denso não modelado (DN), revestido por tecido conjuntivo frouxo (CF). Notar a diferenciação na organização tecidual aos 15 dias (Δ). HE, 100X.

Verificou-se nas amostras de centro tendíneo a fresco, a presença de mesotélio envolvendo tecido conjuntivo frouxo com vasos sangüíneos e tecido conjuntivo denso modelado com fibras dispostas longitudinalmente acentuadamente acidófilas e muitos núcleos basófilos. Em sua porção média, notou-se uma grande quantidade de

tecido adiposo com vasos sangüíneos mais calibrosos do que os encontrados próximo ao mesotélio da cavidade abdominal, seguido por tecido conjuntivo denso, frouxo e mesotélio respectivamente, voltados para a cavidade torácica, demonstrando uma constituição de dupla serosa (Figura 11).

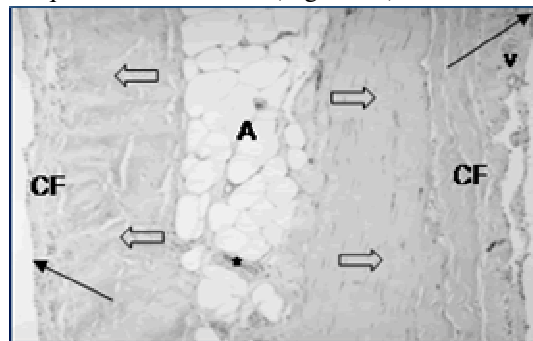


Figura 11. Fotomicrografia de uma amostra de centro tendíneo de bovino a fresco, onde se verifica sua constituição mediante a presença de mesotélio (seta) revestindo tecido conjuntivo frouxo (CF) com vasos sangüíneos (v), tecido conjuntivo denso modelado disposto longitudinalmente (seta vasada), tecido adiposo (A) com vaso sangüíneo (*). HE, 200X.

As amostras de centro tendíneo conservadas em glicerina a 98% exibiram uma desorganização tecidual mais acentuada aos 15 dias e em todos os

períodos notou-se uma menor afinidade para a coloração à eosina (Figuras 12A e 12B).

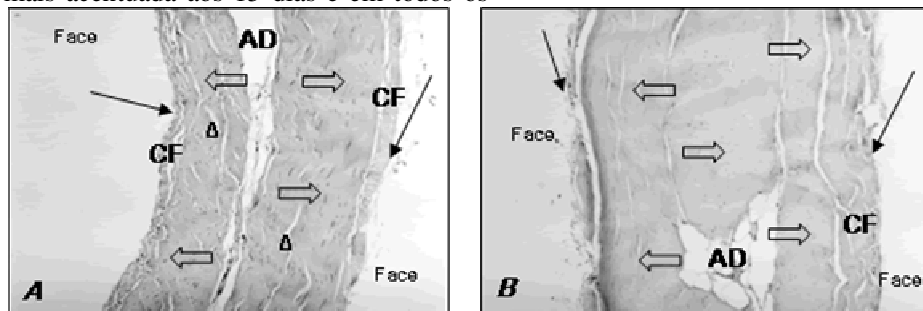


Figura 12. Fotomicrografias de amostras de centro tendíneo conservadas em glicerina a 98%. Em A aos 15 dias e em B aos 60 dias onde se observa estrutura tecidual semelhante a da amostra controle, ou seja, mesotélio (seta) revestindo tecido conjuntivo frouxo (CF) em ambas as margens dando continuidade ao tecido conjuntivo denso modelado (seta vasada) com fibras dispostas longitudinalmente além de apresentar tecido adiposo (AD). Notar a diferenciação na organização tecidual aos 15 dias (Δ). HE, 100X.

DISCUSSÃO

Quanto à integridade morfológica e estrutural das membranas, os resultados do presente estudo, assemelham-se aos relatos de Daleck et al. (1987), que não observaram alterações no aspecto das células mesoteliais e das fibras conjuntivas de peritônio canino autógeno ou homogêneo conservado em glicerina, durante 30, 90 ou 240 dias, implantados em cães. Também estão em concordância com as constatações de Daleck et al. (1988), ao observarem, em outra oportunidade, que o peritônio bovino conservado em glicerina a 98% por 60 dias apresentava-se semelhante ao peritônio a fresco.

O esmaecimento observado nas amostras mantidas em glicerina, provavelmente, deve-se ao fato de que a glicerina, tratando-se de um álcool triídrico de fórmula molecular $C_3H_8O_3$ (LEITE et al. 1979), reage com o citoplasma da célula diminuindo a afinidade tintorial para a eosina e aumentando para a hematoxilina.

A retração observada entre as fibras de colágeno das amostras conservadas em glicerina, principalmente, no período de 15 dias, deve-se ao fato da glicerina apresentar acentuada hidrofília devido a sua polaridade que ao tornar-se livre, é capaz de atrair átomos de hidrogênio das moléculas vizinhas sem, contudo, promover uma reação química preservando a arquitetura tecidual. Entretanto, tanto a glicerina quanto a água,

moléculas polares, apresentam o fenômeno físico-químico de atração mútua. Este fato promove a condensação do volume caracterizando uma ação desidratante que a rigor consiste em redução de volume exercida pela glicerina nas amostras que nela forem conservadas. Esta propriedade é fundamental para explicar tanto a ocorrência da delaminação, ou seja, do deslocamento das camadas do colágeno, quanto ao evento da retração dos núcleos (PIGOSSI et al. 1971).

As alterações observadas nas preparações histológicas, estavam intrinsecamente relacionadas às propriedades da glicerina e não interferiram na integridade tecidual, uma vez que tanto as membranas a fresco quanto as conservadas em glicerina a 98% por períodos entre 15 e 90 dias, apresentaram o mesmo arranjo estrutural.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que a utilização da glicerina a 98% na conservação de membranas biológicas é eficaz uma vez que não foram observadas modificações marcantes na integridade tecidual das membranas estudadas. Assim o sucesso de sua implantação dependerá, em grande parte, da reação biológica no processo de reparação e regeneração tecidual, sugerindo a necessidade de investigações mais específicas sobre esses eventos, principalmente, aquelas envolvendo experimentações "in vivo".

ABSTRACT: Biological membranes are used in surgical procedures to supply a skeleton and to guide the development of new tissues, under repairing processes, wich re-establish the structure and the function of injured tissues. So, with this study it was objectified to evaluate the histological characteristics of bovine tendinous center, dura mater, fascia lata, pericardium, peritoneum and vaginal tunic, fresh and 98% glycerin conserved for periods of 15, 30, 60 and 90 days. It was collected membranes' fragments of ten crossbreed bovines, male, with age between 30 and 36 months, using histological conventional techniques. There was no marking differences as for the morphologic and stuctural integrity of the elements that constitutes the samples of fresh and 98% glycerin conserved material, evidencing mesothelial cells and connective tissue without intense alterations. It was still noticed a weakness in the general coloration and bigger evidenciation of the nucleous in the membranes conserved in glycerin. It can be concluded that glycerin is efficient to the conservation of biological membranes.

KEYWORDS: Biological membranes. Histology. Glycerin. Bovines.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DALECK, C. R.; BAPTISTA, L. C.; MUKAI, L. S. (Ed.). **Tópicos em cirurgia de cães e gatos**. Jaboticabal: FUNEP-UNESP, 1992. p. 33-42.

BATISTA, L. C.; DALECK, C. R.; SHIMANO, A. C.; ALESSI, A. C.; ABRAHÃO, M. S. Estudo comparativo da resistência à tração do peritônio (bovino, equino, suíno e canino) a fresco e conservado em glicerina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 33, supl., p. 305-312, dez. 1996.

COSTA NETO, J. M.; DALECK, C. R.; ALESSI, A. C.; BRAECIALLI, C. S. Tenoplastia experimental do calcâneo em cães com peritônio bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 4, p. 697-703, out./dez. 1999.

DALECK, C. R.; DALECK, C. L. M.; GANDOLFI, W.; ALESSI, A. C. Esofagoplastia cervical no cão com peritônio autólogo ou homólogo conservado em glicerina - "estudo experimental". **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 3, n. 2, p. 195-202, dez. 1987.

DALECK, C. R.; DALECK, C. L. M.; ALESSI, A. C.; PADILHA FILHO, J. G.; COSTA NETO, J. M. Substituição de um retalho diafragmático de cão por peritônio de bovino conservado em glicerina: estudo experimental. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 4, n. 1, p. 53-61, jun. 1988.

DALECK, C. R.; DALECK, C. L. M.; PADILHA FILHO, J. G.; COSTA NETO, J. M. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 22, n. 2, p. 179-183, mai./ago. 1992.

FREITAS-NETO, A. G.; RODRIGUES, C. J.; TOLOSA, E. M. C.; BEHMER, O. A. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. 239 p.

INATOMI, L. S.; PRANTONI, G. A.; ARAÚJO, F. C.; RAISER, A. G.; PEREIRA, S. N.; CARDOSO, G.; BARROS, S. S.; SANTOS, M. N. Implante de dura-máter heteróloga em cães. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v. 10, n. 3, p. 291-297, jun./jul. 1980.

LEITE, J. B. F.; MARQUES, A. F.; GOMES, O. M.; PIGOSSI, N. A glicerina e a preservação de tecidos. **Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, v. 93, n. 3-4, p. 81-84, mai./jun. 1979.

MOTA, F. C. D.; EURIDES, D.; BELLETTI, M. E.; FREITAS, P. M. C.; MASTRANTONIO, E. C.; SHIMIZU, B. J.; CARDOSO, J. R.; MARTINS, A. K. Análise ultra-estrutural da túnica muscular do intestino delgado de cães preservado em diferentes meios. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 1/6, p. 13-17, dez. 2002.

NOLASCO, R. M.; BELETTI, M. E.; EURIDES, D.; SILVA, F. O. C. E.; COELHO, H. E.; DALECK, C. R.; SILVA, L. A. F. Avaliação histológica e ultra-estrutural de tendões de bovinos preservados em diferentes meios. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 3, p. 210-215, dez. 2003.

PIGOSSI, N. **A glicerina na conservação de dura-máter**: estudo experimental. 1967. 83 f. Tese (Livre Docência). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PIGOSSI, N.; RAIA, A.; LEX, A.; GAMA, A. H.; SIMONSEN, O.; HADDAD, J.; STOLF, N.; ZERBINI, E. J.; MINITI, A.; TENUTO, R. Estudo experimental e clínico sobre o emprego como implante da dura-máter homogênea conservada em glicerina à temperatura ambiente. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 8, p. 263-278, out. 1971.

REYES, E. E. F. **Testes físicos comparativos de membranas biológicas preservadas em glicerina, congeladas e a fresco**. 1993. 85 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RODASKI, S.; CUNHA, O.; DE NARDI, A. B.; RIOS, A.; COMAR, F. A.; CASTRO, J. H. T. Artroplastia acetábulo-femoral em cães com pericárdio bovino conservado. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 179-187, 2002.

SARTORI FILHO, F.; GANDOLFI, W.; BANDARRA, E. P. Emprego da membrana biológica (centro frênico) na reparação das lesões tendíneas em coelhos. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 9, p. 69-77, 1997.