

## Avaliação histológica da túnica albugínea bovina como biomaterial conservada em glicerina a 98% e em glutaraldeído a 0,625%\*

Leticia Leal Oliveira<sup>1+</sup>, Julielton de Souza Barata<sup>2</sup>, Alexandre Vinícius Pereira da Silva<sup>2</sup>, Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho<sup>3</sup>, Louisiane de Carvalho Nunes<sup>4</sup> e Edmundo Jorge Abílio<sup>3</sup>

**ABSTRACT.** Oliveira L.L., Barata J.S., Silva A.V.P., Carvalho E.C.Q., Nunes L.C. & Abílio E.J. [Histological evaluation of bovine tunica albuginea as biomaterial conserved in 98% glycerin and in 0.625% glutaraldehyde.] Avaliação histológica da túnica albugínea bovina como biomaterial conservada em glicerina a 98% e em glutaraldeído a 0,625%. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37(4):309-315, 2015. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário s/n, Guararema, Alegre, ES 29500-000, Brasil. E-mail: leticialolive@hotmail.com

Biomaterials have long been studied in reconstructive surgery, both natural and synthetic origin. It can be used as support to host tissue cells development and an efficient bed of stem cells for tissue engineering and regeneration of tissues and organs. The aim of this study was to evaluate the tunica albuginea as biomaterial preserved in glycerin 98% and glutaraldehyde 0.625% and analyze its integrity for use in grafting therapy by microscopic examinations. Tunica albuginea were obtained from healthy adults crossbred cattle from slaughterhouse, tunicas albugineas were preserved in 98% glycerin and 0.625% glutaraldehyde for a period of 30 days at least. Tunica albuginea was fixed in 10% formalin, histologically processed and stained by hematoxylin-eosin, Masson's trichrome and red picrosisrius polarization. Macroscopically there was a difference in the texture and color of tunica albuginea and in glutaraldehyde group were more firm and thick. Microscopic evaluation revealed that both the glycerin and the glutaraldehyde can be used as conservation medium in function of preserving the basic architecture tissue of the tunica albuginea, however, the glycerin was more efficient preservation of cellular structures. Histochemical techniques have highlighted the collagen and elastic fibers present in tunicas albugineas and highlight the predominance of type I collagen refringence revealing more pronounced in samples preserved in glycerin.

**KEY WORDS.** Tunica albuginea, biomaterial, 98% glycerin, 0.625% glutaraldehyde.

**RESUMO.** Os biomateriais em cirurgias reconstrutivas, tanto de origem natural como sintética, têm sido muito pesquisados. Além de servir como suporte para que células do tecido anfitrião se desen-

volvam, podem funcionar como um eficiente ali-  
cerce de células tronco e de bioengenharia tecidual para a regeneração de tecidos e órgãos. O objetivo do presente estudo foi avaliar por meio de exames

\* Recebido em 1 de junho de 2013.

Aceito para publicação em 30 de maio de 2014.

<sup>1</sup> Médica-veterinária, Msc. Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alto Universitário s/n, Guararema, Alegre, ES 29500-000, Brasil e Doutoranda em Ciência Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Avenida Alberto Lamego 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ 28013-602, Brasil. \*Autora para correspondência, E-mail: leticialolive@hotmail.com

<sup>2</sup> Aluno de iniciação científica, Departamento de Medicina Veterinária, CCA, UFES, Alto Universitário s/n, Guararema, Alegre, ES 29500-00.

<sup>3</sup> Médico-veterinário, DSc. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, UENF, Alto Universitário s/n, Guararema, Alegre, ES 29500-00.

<sup>4</sup> Médica-veterinária, PhD. Departamento de Medicina Veterinária, CCA, UFES, Alto Universitário s/n, Guararema, Alegre, ES 29500-00.

microscópicos a viabilidade da túnica albugínea como biomaterial conservado em diferentes meios e atestar sua integridade para o uso em cirurgias reconstrutivas. Foram obtidas túnicas albugíneas de bovinos mestiços, sadios, adultos, provenientes de matadouro frigorífico e conservadas em glicerina a 98%, glutraldeído a 0,625% por um período mínimo de 30 dias. O material foi fixado em formol a 10%, processado histologicamente e corado pelos métodos de hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson e picosisrius red polarização. Macroscopicamente houve diferença na textura e coloração das túnicas e as amostras em glutaraldeído mostraram-se mais firmes e espessas. A avaliação microscópica revelou que tanto a glicerina quanto o glutaraldeído podem ser utilizados como meios de preservação da arquitetura tecidual básica da túnica albugínea, entretanto, a glicerina mostrou-se mais eficiente na preservação das estruturas celulares. As técnicas histoquímicas permitiram evidenciar as fibras colágenas e elásticas presentes nas túnicas e evidenciar a predominância do colágeno tipo I revelando refringência mais acentuada nas amostras conservadas em glicerina.

**PALAVRAS-CHAVE.** Túnica albugínea, biomaterial, glicerina a 98% e glutaraldeído a 0,625%.

## INTRODUÇÃO

Os biomateriais sob a forma de enxertos, tanto de origem natural como sintética, continuam sendo amplamente pesquisados para utilização mais eficiente em cirurgias reconstrutivas. Estes podem servir como ponte para a regeneração do tecido anfitrião, também como alicerce para o desenvolvimento das células tronco e da bioengenharia tecidual. Entretanto, vêm se tornando alvo de debates que põem em questão, sob diversos aspectos, sua viabilidade. Por isso, a grande necessidade de encontrar um biomaterial de fácil aquisição, armazenamento, técnica cirúrgica simples para a implantação e baixo custo. (Oliveira 2008).

Os enxertos são constituídos de células que não apresentam viabilidade no tecido anfitrião, porém, servem como ponte para a regeneração dos tecidos. O material em questão deve atender a exigências quanto as suas propriedades como: não ser antigênico ou carcinogênico, ser facilmente incorporado pelo hospedeiro, funcionando por toda a sua vida, estimulando as propriedades mecânicas do segmento original e ser facilmente armazenado e implantável (Raiser et al. 2001).

Segundo Alvarenga et al. (1992), as membranas biológicas devem ser constituídas quase que ex-

clusivamente por colágeno, por possuírem baixa toxicidade. No entanto, o tecido colágeno possui rápida degradação e por isso é indicado que seja estabilizado, com o objetivo de prolongar a estrutura e integridade mecânica original e remover ou neutralizar suas propriedades antigênicas para que possam ser utilizados em cirurgias reconstrutivas (Baucia et al. 2006).

A túnica albugínea compreende um envoltório do testículo, e trata-se de uma cápsula fibrosa densa de 1 a 2 milímetros de espessura. Esta estrutura é composta de fibras colagenas e sua camada interna é bem vascularizada (Dyce et al. 2002, König & Liebich 2007). Este tecido conservado em glicerina a 98% foi pesquisado como enxerto na cistoplastia de cães. Por ser uma alternativa de baixo custo, conservação e técnica cirúrgica fácil, possui grande concentração de colágeno, confere boa resistência e excelente comportamento biológico, sem sinais de rejeição, respeitando as características ideais para o emprego de um biomaterial em técnicas de enxertia (Oliveira 2008). Segundo Wefer et al. (2002), o uso de túnica albugínea homóloga, como enxerto de matriz acelular em coelhos, na área urogenital, apresentou bons resultados, pois mostrou ser um biomaterial de colágeno capaz de prover um suporte para a regeneração do pênis funcional, de fácil processamento e resistência durante a cirurgia, provê um suporte para a regeneração natural e parece ser satisfatório em reparar defeitos de túnica albugínea.

A glicerina mantida em temperatura ambiente é um meio amplamente utilizado que representa como vantagens baixo custo, fácil manuseio, e apresenta resultados satisfatórios (Versen-Hoeynck et al. 2008). Quando utilizada na concentração de 98% e mantida em temperatura ambiente possui propriedade antisséptica (Alvarenga et al. 1992). Além dessas vantagens, o armazenamento em temperatura ambiente, propicia uma melhor conservação, pois não há formação de cristais intra e extracelulares, além de alterações eletrolíticas deletérias às células e à matriz extracelular (Gioso et al. 2002). O tempo mínimo de conservação do biomaterial na glicerina garante a atenuação imunogênica assim como o seu efeito antimicrobiano (Brun et al. 2004, Mazzanti et al. 2004), com isso, evita-se o uso de drogas antigênicas no pós-operatório (Vulcani et al. 2008).

Algumas características tornam também o glutaraldeído uma excelente opção no tratamento de biomateriais, dentre estas destacam-se a facilidade de aquisição, além de ser econômico e possuir rápida ação no tecido a ser preservado, sendo muito utilizado em biopróteses comerciais. As válvulas

cardíacas fabricadas, oriundas de válvulas aórticas porcinas, normalmente são tratadas em baixas concentrações de solução de glutaraldeído (Khor 1997). Este conservante quando empregado no preparo de pericárdio bovino, proporciona propriedades mecânicas, imunogênicas e flexibilidade, reduz a trombogenicidade e controla a degradação tecidual (Maizato et al. 2008).

O glutaraldeído é capaz de melhorar a estabilidade bioquímica de biomateriais, desencadeando mudanças em suas características mecânicas, tornando-os mais resistentes e permitindo uma melhor incorporação biológica no tecido anfitrião (Rabelo et al. 2004). No entanto, a calcificação do tecido é a mais relevante causa de fracasso dos biomateriais mantidos nesse meio (Baucia et al. 2006), acredita-se que este conservante possua núcleos de ancoragem de cálcio, o que viabiliza esse processo. Entretanto, é uma excelente opção no tratamento de membranas biológica, por ser facilmente encontrado, econômico e agir rapidamente no tecido a ser preservado, sendo muito utilizado em biopróteses comerciais (Khor 1997).

A túnica albugínea bovina possui características que a torna um biomaterial ideal, no entanto existe a necessidade de realizar estudos que busquem meios que possam atuar como conservante capaz de manter adequadamente sua estrutura e integridade, para que possa ser incorporada em novas técnicas de cirurgias reconstrutivas.

Objetivou-se com este trabalho realizar avaliação histopatológica e histoquímica da túnica albugínea bovina conservada em glicerina a 98% e glutaraldeído a 0,625%.

## MATERIAL E MÉTODOS

As túnicas albugíneas, um total de 12, foram obtidas de bovinos mestiços, sadios, adultos, abatidos em frigorífico no município de Atilio Vivacqua, ES. Os testículos foram coletados imediatamente após o abate, transportados sob-refrigeração até o Setor de Cirurgia do Hospital Veterinário da UFES. As túnicas foram obtidas através de uma abertura do testículo em seu eixo longitudinal, seguida da retirada do parênquima testicular com a borda não cortante do bisturi, e imediatamente lavadas com solução salina fisiológica. Logo em seguida, as túnicas foram conservadas em glicerina a 98% e glutaraldeído a 0,625% e acondicionadas em recipientes previamente esterilizados (Figura 1).

As membranas biológicas permaneceram submersas na solução preservadora em frascos fechados e a temperatura ambiente durante um período mínimo de 30 dias, antes de sua avaliação. Após este período, uma amostra tecidual de cada túnica foi fixada em formol a 10% onde permaneceu por um período de 48 horas, após este período as amostras foram analisadas por meio de exame histopatológico e técnicas de histoquímica.

Após a fixação em formol a 10%, as peças foram lavadas e submetidas a processamento tecidual para inclusão em parafina. As amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina para inclusão em parafina. Em seguida, foi realizada a microtomia para a secção de cortes histológicos de cinco micrômetros. Os

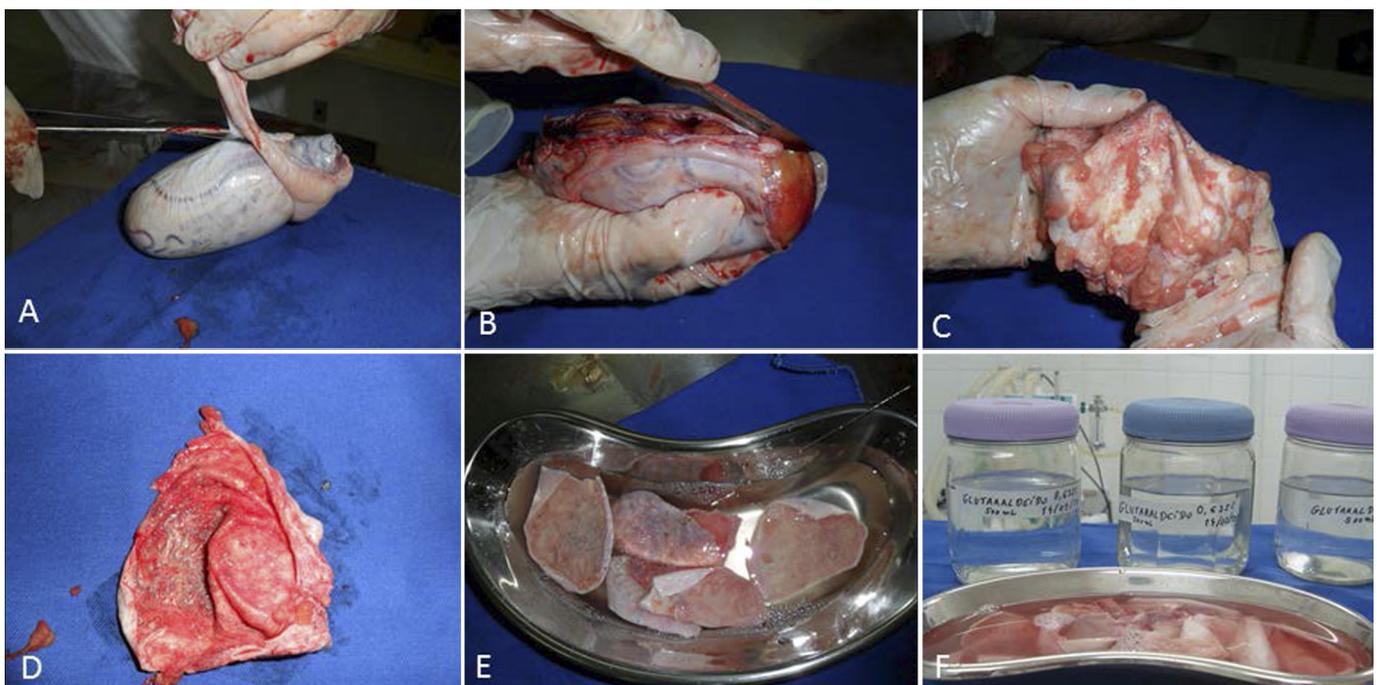


Figura 1. Preparo e armazenamento das túnicas albugíneas bovina. (A) Retirada do epidídimo com tesoura, (B) abertura da túnica albugínea com o bisturi, (C) retirada do parênquima testicular, (D) túnica após o toailete completo, (E) lavagem em solução fisiológica (NaCl 0,9%), (F) frascos previamente esterilizado contendo meios de preservação.

fragmentos foram depositados em lâminas de vidro com extremidade fosca e corados pelos métodos hematoxilina-eosina (HE), tricrômico de Masson e picosirius red - polarização, para avaliação das alterações morfológicas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as túnicas albugíneas revelaram diferença macroscópica em relação à coloração e textura das amostras em cada conservante.

Neste estudo, observou-se que a túnica albugínea bovina conservada em glicerina a 98% apresentava aspecto firme e coloração vermelho escura. Notou-se ainda que a arquitetura vascular foi preservada e que houve redução da maleabilidade devido ao processo de desidratação. A desidratação ocasionada pela glicerina a 98% está relacionada com sua ação antimicrobiana (Pigossi 1967, Pigossi et al. 1971) e é totalmente revertida após poucos minutos em solução fisiológica. Este procedimento é realizado previamente a utilização das túnicas albugíneas em cirurgias reconstrutivas como sugerido por Pigossi et al. (1971).

As túnicas albugíneas conservadas em glutaraldeído a 0,625% revelaram coloração brancacenta, textura mais firme e espessamento. Este fato pode estar relacionado com o aumento da resistência a tração de biomateriais tratados por este meio Batista et al. (1996). Neste conservante não foi possível delimitar o mapeamento vascular macroscopicamente quanto nas túnicas conservadas em glicerina.

As Figuras 2 e 3 ilustram as características macroscópicas observadas nas túnicas preservadas em glicerina a 98% e glutaraldeído a 0,625%.

Assim como descrito por König & Liebich (2007), a túnica albugínea mostrou-se um espesso envoltório do parênquima testicular, rico em fibras colágenas e vascularizado. Polguy et al. (2011) também verificaram intensa vascularização neste tecido e afirmaram que parte dessa rica vascularização se dá pela presença de ramos acessórios da artéria testicular originada na margem posterior do testículo. Neste estudo pode-se confirmar pela avaliação microscópica que a túnica albugínea manteve sua arquitetura preservada após 30 dias nos diferentes meios de conservação e que a presença de vasos foi evidenciada com o uso de diferentes técnicas histoquímicas.

Craatz et al. (2005) descreve histologicamente, a túnica albugínea, como uma malha formada por tecido conjuntivo denso e rico em fibras elásticas, tendo com isso uma boa capacidade de expansão. Ao mesmo tempo em que é maleável apresenta boa rigidez. Conforme Staut et al. (2007), este tecido

conjuntivo denso é classificado como não-modelado ou levemente modelado uma vez que possui feixes de fibras de colágeno grosseiros entrelaçados, dispostos ao acaso, formando uma rede que resiste

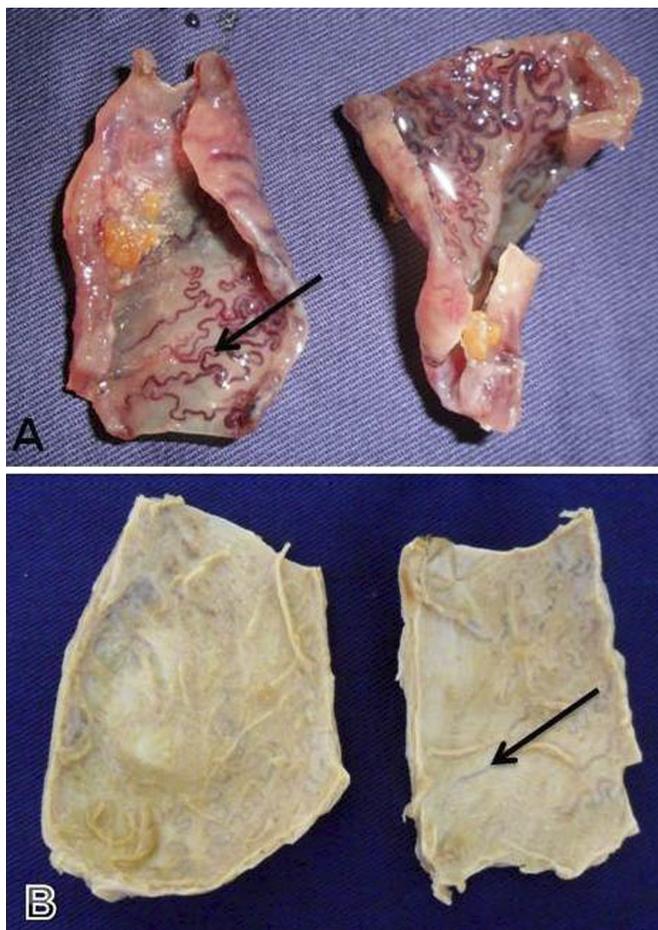


Figura 2. Comparação entre as túnicas preservadas em meios distintos. (A) TA conservadas em glicerina a 98%, reparar a evidencição de vasos sanguíneos (seta). (B) túnicas conservadas em glutaraldeído a 0,625%, com vasos sanguíneos menos evidentes (seta).



Figura 3. Túnica albugínea de bovino conservadas em glutaraldeído a 0,625%, notar espessamento da amostra e textura pouco maleável.

a trações de todas as direções. Há predominância de colágeno tipo I, um tipo mais maduro e por isso com maior resistência o que representa excelente vantagem quando utilizada como enxerto.

Neste estudo essas estruturas foram observadas constituindo a túnica albugínea mesmo após 30 dias submersas em meios de glicerina 98% e glutaraldeído 0,625%. Desta forma, comprova-se a eficácia destes meios na preservação estrutural da túnica. As estruturas observadas compreendem a fibras elásticas, fibroblastos e fibras colágenas como podem ser observadas na Figura 4.

A arquitetura básica da túnica albugínea bovina foi mantida após 30 dias nos meios em questão, porém, observou-se diferença entre os meios em sua capacidade de preservar a integridade das estruturas celulares. Neste caso, a glicerina a 98% promoveu a preservação do tecido, observando-se que 100% das túnicas em glicerina mantiveram a integridade da camada serosa, tecido conjuntivo denso não-modelado e vascularização, o que corrobora com os resultados obtidos por Gioso et al. (2002). Além disso, no estudo citado se afirmou que o armazenamento em temperatura ambiente, propicia uma melhor conservação, pois não há formação de cristais intra e extracelulares, além de alterações

eletrolíticas deletérias às células e à matriz extracelular. Com isso, a arquitetura tecidual do material tratado neste meio é mantida.

O tempo mínimo de conservação do biomaterial na glicerina garante a atenuação imunogênica assim como o seu efeito antimicrobiano, segundo Brun et al. (2004) e Mazzanti et al. (2004). Este efeito antimicrobiano foi comprovado na avaliação microscópica em que não se observou presença de colônias bacterianas.

Ao contrário das túnicas conservadas em glicerina, no grupo de túnicas preservadas em glutaraldeído, observou-se certo grau de condensação e degeneração de fibras colágenas, mostrando maior espessamento entre estas (Figura 4). Estas fibras estavam mais fragmentadas e havia sinais de autólise tecidual com a ausência de células como os fibroblastos ou fibrócitos.

Na parede dos vasos da túnica albugínea testicular bovina, tratados com glutaraldeído, havia áreas de pouca afinidade tintorial, fato que pode estar relacionado com a menor capacidade de preservação deste meio, uma vez que isto indica áreas de autólise (Figura 4). O mesmo não ocorreu quando o biomaterial foi tratado com glicerina, pois a parede vascular se mostrava íntegra. Isto demonstra a

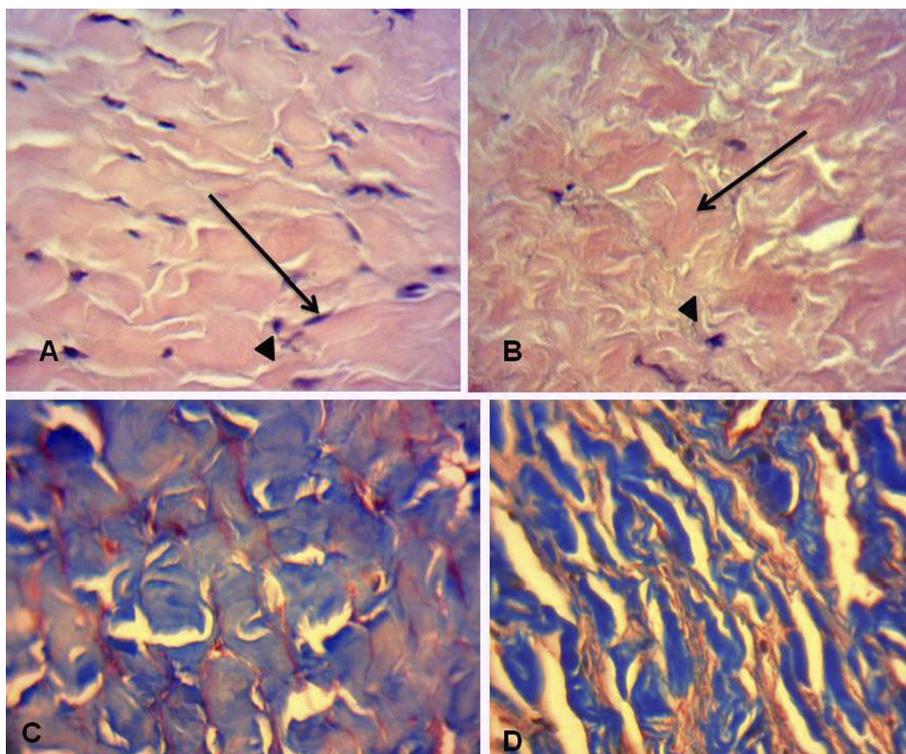


Figura 4. Fotomicrografia de túnica albugínea bovina. (A) TA conservada em glicerina 98%, presença de fibrócito (seta) e fibras colágenas (cabeça de seta), coloração de HE, objetiva de 40x. (B) TA conservada em glutaraldeído a 0,625%, presença de fibras colágenas íntegras (seta) e autolisadas (cabeça de seta), coloração de HE, objetiva de 40x. (C) TA conservada em glicerina 98%, fibras colágenas íntegras destacadas em azul, coloração de tricrômico de Masson, objetiva de 40x. (D) TA conservada em glutaraldeído a 0,625%, fibras colágenas condensadas destacadas em azul, coloração de tricrômico de Masson, objetiva de 40x.

característica preservadora da arquitetura tecidual deste meio como citado por Alvarenga (1992).

O material corado pelo método de picrossirius red polarização revelou que tanto nas amostras conservadas em glicerina quanto em glutaraldeído houve predomínio do colágeno tipo I. Notou-se que a refringência das fibras colágenas entre os dois meios foi diferente. As amostras conservadas em glicerina mostraram forte refringência à luz polarizada evidenciando a coloração amarelo-alaranjada. Por outro lado, as amostras conservadas em glutaraldeído a refringência das fibras foi mais fraca. Acredita-se que a intensidade de coloração das fibras colágenas foi mais evidente nas túnicas conservadas em glicerina devido à melhor preservação da integridade celular neste meio.

A Figura 5 ilustra a diferença de refringência das fibras colágenas observadas à luz polarizada.

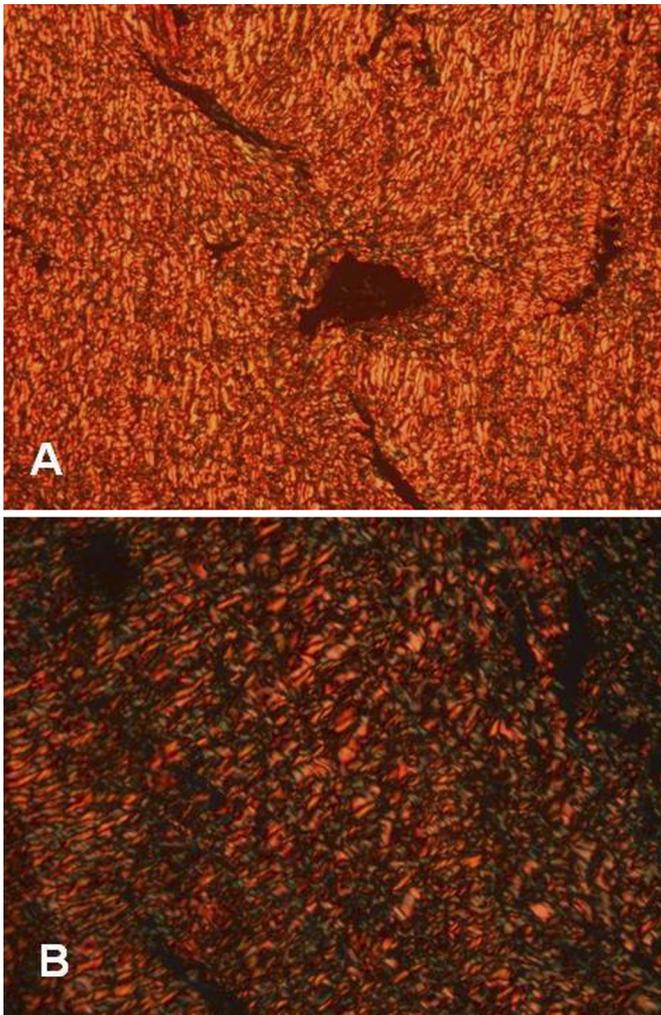


Figura 5. Fotomicrografia de túnica albugínea bovina coloração de picrossirius red polarização. (A) Túnica albugínea bovina conservada em glicerina 98%, notar forte refringência das fibras colágenas, objetiva de 10x. (B) Túnica albugínea bovina conservada em glutaraldeído a 0,625%, notar fraca refringência das fibras colágenas, objetiva de 20x.

## CONCLUSÃO

Na vigência dos resultados obtidos e para os parâmetros utilizados no presente experimento, é pertinente concluir que tanto a glicerina a 98% quanto o glutaraldeído a 0,625% atuam como excelentes meios na preservação da arquitetura tecidual básica da túnica albugínea bovina, entretanto, a glicerina mostrou-se mais eficiente na preservação das estruturas celulares.

A utilização de técnicas histológicas e histoquímicas representa uma importante ferramenta para avaliação microscópica de membranas biológicas conservadas.

## REFERÊNCIAS

- Alvarenga J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia, p.33-42. In: Daleck C.R., Baptista L.C. & Mukai L.S. (Eds), *Tópicos em cirurgia de cães e gatos*, FUNEP-Unesp, Jaboticabal, 1992.
- Batista L.C., Daleck C.R., Shimano A.C., Alessi A.C. & Abrahão M. de S. Estudo comparativo da resistência à tração do peritônio (bovino, eqüino, suíno e canino) a fresco e conservado em glicerina. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 33(Supl.):305-312, 1996.
- Baucia J.A., Leal Neto R.M., Rogero J.R. & Nascimento N. Tratamentos anticalcificantes do pericárdio bovino fixado com glutaraldeído: Comparação e avaliação de possíveis efeitos sinérgicos. *Braz. J. Cardiovasc. Surg.*, 21:180-187, 2006.
- Craatz S., Spänzel-Borowski K., Begemann J.F., Olianias R., Fisch M. & Hohenfellner R. The dorsal lamina of the rectus sheath: a suitable grafting material for the penile tunica albuginea in Peyronie's disease? *Braz. J. Urol.*, 97:134-137, 2006.
- Dyce K.M., Sack W.O. & Wesing C.J. *Veterinary Anatomy*. Elsevier, Philadelphia, Pennsylvania, 2002, p.183-192.
- Gioso M.A., Benites N.R. & Kämpf G. Análise microbiológica de ossos de cães conservados por longo período de tempo na glicerina a 98% à temperatura ambiente, objetivando a enxertia óssea. *Acta Cirúrg. Bras.*, 17:242-246, 2002.
- Junqueira L.C. & Carneiro J. *Histologia Básica*. 10ª Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004. 433p.
- Khor E. Methods for the treatments of collagenous tissues for bioprostheses. *Biomaterials*, 18:95-105, 1997.
- Mazzanti A., Raiser A.G., Pippi N., Barros C.S.L., Brondani J.T., Marin A., Silva T.R., Hille R., Salbego F.Z., Stieven D., Rohde R. & Dalmolin F. Homoimplante Ortotópico Conservado, Associado à Terapia "Soft Laser" na Reparação Tenopater em Cão. *Ciência Rural*, 34:429-437, 2004.
- Maizato M.J.S., Pires M.D., Canzian M., Higa O.Z., Pitombo R.M.N. & Leirner A.A. Histological evaluation of biocompatibility of lyophilized bovine pericardium implanted subcutaneously in rats. *Artificial Organs*, 32:4, 2008.
- Oliveira L.L. *Reconstituição vesical em cães (Canis familiaris): xenoenxerto com túnica albugínea bovina conservada em glicerina a 98%*. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ, 2008. 59p.
- Pigossi N., Raia A., Gama A.H., Simonsen O., Haddad J., Stolf N.A.G., Zerbini E.J., Miniti A. & Tenuto R. Estudo Experimental e Clínico sobre o Emprego, como implante, da Dura-Máter Homógena Conservada em Glicerina à Temperatura Ambiente. *Rev. Assoc. Méd. Bras.*, 17:263-278, 1971.
- Pigossi N. A Glicerina na Conservação de Dura-Máter. Estudo Experimental. Tese (Livro-Docência), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, 1967. 36p.
- Polgaj M., Sopinski M., Jedrzejewski K., Bolanowski W. & Topol M.

- Angioarchitecture of the bovine tunica albuginea vascular complex - A corrosive and histological study. *Res. Vet. Sci.*, 91:181-187, 2011.
- Rabelo R.E., Tavares G.A., Paulo N.M., Silva L.A.F., Damasceno A.D., Andrade M.A., Martins F.G., Romani A.F., Silva O.C. & Trindade B.R. Características Físicas e Microbiológicas do Centro Tendíneo Diafragmático Bovino Conservado em Glicerina a 98% e no Glutaraldeído a 4%. *Ciência Animal Brasileira*, 5:229-238, 2004.
- Raiser A.G., Graça D.L., Pippi N.L., Zinn L.L., Silveira D.S., Bordin A.I., Balotto G.C., Rios M.V. & Silveira A.F. Homoimplante Ortotópico de Tendão Calcâneo em Cães Conservação, Assepsia e Implantação. *Ciência Rural*, 31:89-94, 2001.
- Staut J.L. Estudo histoquímico da matriz extracelular de neoplasias testiculares de cães. *Estudos de Biologia*, 29:243-247, 2007.
- Versen-hoeynck F.V., Steinfeld A.P., Becker J., Hermel M., Rath W. & Hesselbarth U. Sterilization and preservation influence the biophysical properties of human amnion grafts. *Biologicals*, 36:248-255, 2008.
- Vulcani V.A.S., Mascoris D.G., Plepis A.M.G., Martins V.C.A. & Lapeina M.H. Obtenção, caracterização e aplicação cirúrgica de matrizes de colágeno na parede abdominal de equínos. *Ciência Animal Brasileira*, 9:778-785, 2008.
- Wefer J., Schlote N., Sekido N., Sievert K.D., Wefer A.E., Nunes L., Bakircioglu M.E., Dahiya R. & Tanagho E.A. Tunica Albugínea Acellular Matrix Graft for Penile Reconstruction in the Rabbit: a Model for Treating Peyronies Disease. *Braz. J. Urol. Intern.*, 90:326-331, 2002.