

January 2016

Implantes de membranas biológicas en cirugía reconstructiva veterinaria: aspectos básicos y métodos de conservación

Dunia Yisela Trujillo Piso

Universidad Cooperativa de Colombia, dunia.trujillo@campusucc.edu.co

Wilmer Alejandro Zamora Restán

Universidad Estadual Paulista, alejomvz_1208@gmail.com

Mónica Yamile Padilla Barreto

Universidad de La Salle, mpadilla03@unisalle.edu.co

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/mv>

Citación recomendada

Trujillo Piso DY, Zamora Restán WA y Padilla Barreto MY. Implantes de membranas biológicas en cirugía reconstructiva veterinaria: aspectos básicos y métodos de conservación. Rev Med Vet. 2016;(31): 105-120. doi: <https://doi.org/10.19052/mv.3714>

This Artículo de Investigación is brought to you for free and open access by the Revistas científicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Revista de Medicina Veterinaria by an authorized editor of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

Implantes de membranas biológicas en cirugía reconstructiva veterinaria: aspectos básicos y métodos de conservación

Dunia Yisela Trujillo Piso¹ / Wilmer Alejandro Zamora Restán² / Mónica Yamile Padilla Barreto³

Resumen

Las membranas biológicas se emplean como implantes en cirugía veterinaria reconstructiva con el objetivo de restablecer la función y la estructura de tejidos dañados. Diversos tejidos obtenidos de animales, conservados por diferentes técnicas e implantados en receptores de la misma o de diferente especie, permiten reparar heridas en las que es evidente la extensa pérdida tisular o la imposibilidad de inducir cicatrización por primera intención. Aunque las bondades de las membranas biológicas son mayores que sus desventajas, su uso en la rutina clínica y quirúrgica no es frecuente, en gran parte por el desconocimiento de sus características, manipulación e implantación. La presente revisión pretende recopilar los aspectos generales que envuelven las membranas biológicas, desde su obtención hasta las posibles complicaciones de su uso, a través de estudios experimentales y reportes de caso relacionados con anterioridad, e incentivar su uso como biomaterial de implante en defectos anatómicos, heridas traumáticas, postoperatorios oncológicos y traumas en general.

Palabras clave: animales, cirugía, membranas biológicas, reconstrucción, reparación.

- 1 Médica veterinaria zootecnista. MSc. en Cirugía Veterinaria. Docente de Cirugía Veterinaria, Universidad Cooperativa de Colombia, sede Ibagué, Colombia. Miembro del grupo de investigación Impronta. ✉ dunia.trujillo@campusucc.edu.co
- 2 Médico veterinario zootecnista. Estudiante del programa de Maestría en Clínica Médica, Universidad Estadual Paulista, Brasil. ✉ alejomvz_1208@gmail.com
- 3 Médica veterinaria zootecnista. Estudiante del programa de Maestría en Ciencias Veterinarias, Universidad de La Salle, Colombia. ✉ mpadilla03@unisalle.edu.co

Biological membrane implants in veterinary reconstructive surgery: Basic aspects and conservation methods

Abstract

Biological membranes are used as implants in veterinary reconstructive surgery in order to restore the function and structure of damaged tissues. Various tissues from animals, kept by different techniques and implanted in recipients of the same or different species, help repair wounds where extensive tissue loss or the inability to scarring is evidenced. Although the benefits of biological membranes outweigh their disadvantages, their use in clinical and surgical routines is rare, largely due to ignorance of their characteristics, handling and implantation. The present article aims to review general aspects on biological membranes, from procurement to possible complications of their use, through experimental studies and previously reported cases, and to encourage their use as a biomaterial implant in case of anatomical defects, traumatic wounds, oncological postoperative care, and traumas in general.

Keywords: animals, biological membranes, surgery, reconstruction, repair.

Cómo citar este artículo: Trujillo Piso DY, Zamora Restán WA, Padilla Barreto MY. Implantes de membranas biológicas en cirugía reconstructiva veterinaria: aspectos básicos y métodos de conservación. Rev Med Vet. 2015;(31):105-120.

Implantes de membranas biológicas en cirugía reconstructiva veterinaria: aspectos básicos e métodos de conservación

Resumo

As membranas biológicas se empregam como implantes em cirurgia veterinária reconstructiva com o objetivo de restabelecer a função e a estrutura de tecidos destruídos. Diversos tecidos obtidos de animais, conservados por diferentes técnicas e implantados em receptores da mesma ou de diferente espécie, permitem reparar feridas aonde é evidente a extensa perda tissular ou a impossibilidade de induzir cicatrização por primeira intenção. Ainda que as bondades das membranas biológicas sejam maiores que suas desvantagens, seu uso na rotina clínica e cirúrgica não é frequente, em grande parte pelo desconhecimento de suas características, manipulação e implantação. Esta revisão pretende recopilar os aspectos gerais que envolvem as membranas biológicas, desde sua obtenção até as possíveis complicações de seu uso, através de estudos experimentais e relatórios de caso relatados com anterioridade, e incentivar seu uso como bio material de implante em defeitos anatómicos, feridas traumáticas, pós-operatórios oncológicos e traumas em geral.

Palavras chave: animais, membranas biológicas, cirurgia, reconstrução, reparação.

INTRODUCCIÓN

Durante la rutina clínica y quirúrgica de pequeños y grandes animales, la presentación de casos que cursan con pérdidas extensas y complejas de tejidos es frecuente; su tratamiento, en la mayoría de los casos, requiere de técnicas de cirugía plástica, tendientes a restablecer la morfología y función del órgano afectado (1,2). La palabra *plástica* se deriva del griego *plastikós* que significa 'moldear' o 'reparar', y su aplicación en cirugía se divide en dos ramas principales: la *cirugía plástica estética*, que es aquella con la que se pretende modificar las variaciones de la normalidad a lo más cercano posible de aquello que se concibe como el patrón de belleza, y la *cirugía plástica reconstructiva o reparadora*, que es aquella que aplica técnicas quirúrgicas que buscan reparar tejidos, reponer sustancias perdidas y rehabilitar funciones de órganos enfermos, generalmente afectados a consecuencia de traumas, neoplasias, enfermedades o defectos congénitos (3). En los últimos años, la realización de cirugías plásticas reconstructivas ha impulsado un acelerado crecimiento en la creación y utilización de materiales o de tejidos que apoyan estos procedimientos, lo que a su vez

ha incentivado en los cirujanos el uso frecuente de injertos, implantes y trasplantes (4).

Si bien los términos *implante*, *injerto* y *trasplante* ocasionalmente se emplean de forma indiferenciada, es necesario reconocer las particularidades que cada uno de ellos posee. El término *trasplante* tiene implícita la transferencia de tejido vivo, en la que el órgano trasplantado asume la función del órgano dañado receptor (5,6). Por su parte, el término *implante* hace referencia a la implantación de material biológico no viable y que no contiene fracción celular como las conocidas membranas biológicas, al tiempo que considera el uso de materiales no biológicos en un lecho receptor, como los implantes metálicos utilizados en la osteosíntesis de fracturas (5,7). Por último, el término *injerto* consiste en la transferencia de un tejido o parte de un órgano desde un lugar o donador (sin llevar su propio suministro de sangre), para un lecho receptor, lo que lleva al desarrollo de un tejido nuevo y al final restablece las estructuras afectadas (8,9).

Particularmente, los injertos han sido a su vez clasificados en función de la relación hospedero-donante, del origen,

de la forma y del espesor. De acuerdo al origen, ellos son denominados como: *autoinjertos* o *injertos autólogos*, aquellos que son transferidos de un lugar del donante, para un lecho receptor del mismo animal; *aloinjertos* u *homoinjertos* (homólogos) son los transferidos entre individuos de la misma especie, y *xenoinjertos* o *heteroinjertos* (heterólogos) son aquellos realizados entre individuos de especies diferentes (9). Pero si se tienen en cuenta los conceptos de cada procedimiento arriba citados, la mayoría de alo- y xenoinjertos realmente son *alo-* y *xenoinjertos* (10).

Los implantes pueden realizarse con tejidos sin componente celular. Estos tejidos son conocidos como membranas biológicas y son obtenidos de animales donantes, la mayor parte de ellos sin vida (11,12). Las membranas biológicas han sido frecuentemente utilizadas en medicina humana; en medicina veterinaria, su uso se conoce desde 1967, cuando Pigossi (13) empleó duramadre homóloga, conservada en glicerina en perros. Este procedimiento le abrió las puertas a un amplio pero tímido desarrollo de la cirugía reconstructiva veterinaria, que hoy en día incluye el uso de diversos tejidos obtenidos de bovinos, caninos, equinos y porcinos principalmente (14-20).

A partir del primer relato existente al respecto del uso de membranas biológicas en cirugía veterinaria, han sido empleados como implantes para apoyar la reparación tisular: fascia lata (21-23), membrana amniótica (24,25), pericardio bovino (26-28), cartilago auricular (29,30), pericardio equino (31), peritoneo bovino (32), ligamento nugal bovino (33), submucosa intestinal porcina (34), tendones porcinos (35), matriz dérmica acelular (ADM) (36), vena yugular (37), tendón calcáneo (38), submucosa de intestino delgado canino (39), entre otras.

HISTOLOGÍA DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Todos los tejidos empleados como membranas biológicas poseen una característica común: son ricos en tejido conectivo, y las propiedades de este las convierten

en bioimplantes altamente efectivos para apoyar la reparación tisular al contribuir con la aproximación de los tejidos. El tejido conectivo está conformado estructuralmente por células, fibras y matriz extracelular. Las células predominantes son los fibroblastos, las mesenquimatosas, los macrófagos y las reticulares. Las fibras incluyen proteínas poliméricas de tres tipos: colágenas, reticulares y elásticas (40). La matriz extracelular es el principal material presente en un tejido conectivo y está, a su vez, compuesta por fibras proteínicas y por una sustancia intercelular o fundamental que posee proteoglicanos, glicoproteínas y agua (41,42).

Si se analizan de forma detallada los componentes de un tejido conectivo o de una membrana biológica, se logra tener claridad de por qué su uso contribuye a un proceso de reparación, puesto que, específicamente, las fibras colágenas y la matriz extracelular presentes en estos proporcionan factores esenciales para el soporte y nutrición celular, lo cual agiliza y enriquece el proceso de reparación en el tejido afectado (40).

Las fibras colágenas son proteínas orgánicas y son consideradas las proteínas estructurales más importantes de un organismo; proporcionan fuerza de tensión a los tejidos y forman fibras flexibles de gran resistencia (40). La composición de colágeno en un tejido es variable, pero la mayoría de los tejidos empleados en cirugía reparadora tienen un porcentaje alto de esta proteína (26).

La matriz extracelular también hace que las membranas biológicas sean útiles en la cirugía reconstructiva, puesto que aporta un alto contenido de proteoglicanos y glicosaminoglicanos: condroitina sulfato, queratán sulfato, heparán sulfato, dermatán sulfato y ácido hialurónico, todos estos con diversas funciones como: resistencia a la compresión y tensión, funciones de “relleno”, almacenamiento de agua y electrolitos, propiedades antibacterianas, reserva energética celular, participación en la adhesión y migración celular, en la orientación de las fibras de colágeno, inhibición de enzimas proteolíticas, protección de las membranas celulares de la acción de los radicales libres y actividad antiinflamatoria, entre otras (43,44).

PROPIEDADES DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Las membranas biológicas son tejidos de fácil obtención y almacenamiento, bajo costo, requieren de técnicas de preparación, implantación y esterilización simples; son de fácil almacenamiento y ocasionan la mínima reacción tisular en el tejido donde son implantadas (26). Las características y propiedades de este tipo de membranas favorecen los procesos de reparación, puesto que ofrecen ayuda para el desarrollo y orientación de nuevos tejidos y preconizan la neovascularización local, lo cual hace que se restablezca la estructura del órgano afectado (24,26,45).

Las membranas biológicas previenen la deshidratación de los tejidos y la muerte celular; estimulan la angiogénesis y por tanto crean un puente de soporte trófico en las heridas. Retienen las enzimas y el agua que ayuda en la fibrinólisis y reducción del dolor atribuida a la protección que el medio húmedo ofrece a las terminaciones nerviosas ante la resequeidad y exposición. El uso de estas membranas mantiene las células viables y permite que ellas liberen factores de crecimiento, lo cual estimula su proliferación (46).

OBTENCIÓN DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS PARA CIRUGÍA PLÁSTICA RECONSTRUCTIVA VETERINARIA

Obtener una membrana biológica para implantarla en un animal cuya alteración anatómica lo amerite es un proceso poco complejo, puesto que los donantes pueden ser individuos de la misma especie y de especies diferentes, y por tanto se pueden realizar alo- y xenoinjertos (10). Las membranas biológicas pueden ser obtenidas de animales de abasto. Centro tendíneo, duramadre, fascia lata, pericardio y túnica vaginal son algunos ejemplos de membranas biológicas provenientes de bovinos (47,48).

Equinos, porcinos y lagomorfos también son potenciales donantes de membranas biológicas como cápsula renal equina, membrana amniótica de yegua, cartilago auricular de conejos y peritoneo porcino. Para su obtención,

en países o regiones donde no se cuenta con plantas de beneficio (para el caso de los equinos), estos implantes se extraen de animales sometidos a eutanasia derivados de fracturas o por otras causas no infecciosas (45,49,50). Las membranas también pueden ser obtenidas de caninos llevados a hospitales o clínicas veterinarias, donde por causas no infecciosas debieron ser sometidos a eutanasia. Peritoneo, membrana amniótica, fascia lata y pericardio canino son ejemplos de membranas obtenidas en esta especie (17,21,45).

Los bioimplantes obtenidos en plantas de sacrificio u hospitales veterinarios se colectan, se lavan con agua corriente para retirar excesos tisulares y restos de sangre propios del proceso; se transportan hasta un laboratorio bajo refrigeración, donde se transfieren a frascos estériles a los cuales se les adiciona un medio de conservación como la glicerina al 98 % u otros y se mantienen a temperatura ambiente (47,48). Algunos autores sugieren que antes de incluir las membranas en la solución conservante, estas deben sumergirse en una solución de yodopolivinilpirrolidona al 1 % durante 24 horas, en frascos ámbar previamente identificados y tamponados, con el fin de impedir el crecimiento bacteriano (51,52). Una vez completadas las 24 horas, las membranas son lavadas con cloruro de sodio al 0,9 % estéril para la remoción de residuos de la solución de yodo (25,53).

Membranas biológicas, como la membrana amniótica, requieren de un proceso levemente más delicado, que otras membranas, puesto su obtención se realiza durante la cesárea o parto de una hembra equina, canina, bovina y de humanos (24,25,54,55) no portadores de enfermedades infecto-contagiosas, con feto a término y bajo técnicas asépticas. De esta forma, se obtiene la placenta, se somete a lavado con solución fisiológica 0,9 % y con una solución tampón de fosfato estéril que contenga penicilina, estreptomina, neomicina y anfotericina B o cefalotina. Posteriormente se separa el amnios del corion por desprendimiento y se fija sobre un papel filtro de nitrocelulosa estéril, con poros de 0,45 μm , con la cara epitelial dirigida hacia arriba. La membrana adherida al papel puede ser recortada en fragmentos y colocados en un medio estéril para preservación (56).

PRINCIPALES MEMBRANAS EMPLEADAS EN CIRUGÍA VETERINARIA RECONSTRUCTIVA

A pesar del gran número de membranas usadas como implantes, importantes reportes de casos y estudios originales han mostrado la utilidad de las membranas biológicas en cirugía veterinaria, dentro de los que se destaca la membrana amniótica, el pericardio bovino, el pericardio equino, el cartílago auricular y la fascia lata.

Membrana amniótica

Los primeros registros del uso de la membrana amniótica en cirugía se conocieron en 1910, cuando este tejido se usó para reforzar trasplantes de piel (57); posteriormente, se empleó en ulceraciones y quemaduras cutáneas con resultados favorables como reducción del dolor y aumento de la velocidad de reepitelización (58,59). Ya en 1940, la membrana amniótica comenzó a utilizarse en alteraciones de la superficie ocular, aunque con respuestas no muy exitosas (60). Después de casi 50 años, la membrana amniótica se probó de nuevo en la superficie ocular con mejores resultados que los descritos en 1940. Kim y Tseng (56) la emplearon para reconstruir córneas de conejo con deficiencia de hemocitoblastos límbicos, investigación que ha motivado innumerables pruebas de esta membrana en humanos y animales con afecciones oculares principalmente corneales y conjuntivales.

La membrana amniótica tiene características especiales que han motivado su uso en cirugía reconstructiva, pues su epitelio posee efecto protector, bacteriostático, reduce el dolor, mejora la epitelización y es poco antigénica (61). Cuando esta membrana se usa como implante, se posiciona con su cara epitelial o membrana basal sin entrar en contacto con la superficie que se va a reparar, mientras que en los casos en que se utiliza como vendaje oclusivo, su cara epitelial entra en contacto con la superficie que se va a reparar para proteger la reacción inflamatoria, mientras la epitelización ocurre sobre ella (62).

Barros y colaboradores (63) evaluaron el uso de membrana amniótica en tres casos diferentes de alteraciones

corneales y esclerales: simblefarón bilateral en un felino (como adyuvante en la reparación corneal y conjuntival), queratomalacia en un canino (para mejorar los resultados del flap de tercer párpado) y en un canino con histiocitoma de córnea, posterior a la resección quirúrgica. Los resultados obtenidos en estos tres casos permitieron afirmar que la membrana amniótica, además de contribuir en la reparación corneal, lleva a la formación de una cicatriz mínima, resultado que es altamente satisfactorio para la conservación de la transparencia ocular.

En felinos con secuestro corneal y en caninos con úlceras corneales refractarias, la membrana amniótica bovina se implantó, posterior a la queratectomía y como adyuvante en el tratamiento de la úlcera respectivamente. Estos pacientes recuperaron aproximadamente el 90% de la transparencia corneal después de los implantes (25). En alteraciones no oculares, como heridas de piel infectadas en conejos, se empleó membrana amniótica conservada en glicerina al 98%, y aunque al implantarla no desencadenó cambios significativos en las fases de inflamación, epitelización y fibroplasia, sí hubo aumento en la fase de angiogénesis. Este resultado es ideal para considerarla dentro de la terapia de las heridas, incluso contaminadas (64).

Los implantes de membrana amniótica homóloga conservada al 98% fueron empleados para reforzar el proceso de reparación de heridas en miembros locomotores de equinos. Los resultados de este estudio mostraron disminución del tiempo de cicatrización, menor formación del tejido de granulación y menor incidencia de bacterias en el tejido receptor (24). Estudios excepcionales no apoyan las bondades de la membrana amniótica en el tratamiento de heridas cutáneas, puesto que durante sus estudios no hubo reducción de la infección, ni aceleración de la reparación (17,51).

Pericardio bovino

El pericardio bovino ha sido utilizado no solamente en medicina veterinaria, sino también en medicina humana, en especial en cirugía cardiovascular, en la cual se usa principalmente en la corrección de cardiopatías congéni-

tas. Esto fue registrado por Rendón y colaboradores (65) para reparación de tetralogía de Fallot y defectos septales, cuyos resultados relatan una tasa de supervivencia de los pacientes implantados del 95%; estos factores han motivado la comercialización masiva de este tejido para cirugía cardiovascular (Biocardio®, Edwards Lifesciences®, Vivendi-Membrana de Pericárdio Bovino L-Hydro®, PB® - Patch de Pericárdio Bovino - Enxerto Heterólogo de Pericárdio Bovino®).

En cirugía veterinaria, Santillán y colaboradores (27) evaluaron características *in vitro* del pericardio bovino conservado en glutaraldehído y lo emplearon en la reconstrucción de defectos de pared toracoabdominal en caninos. Con ello mostraron que es un tejido con suficiente resistencia, útil en la reparación de defectos de pared abdominal, puesto que además de que colaboró corrigiendo la alteración no hubo infección ni rechazo al tejido, y su fuerza tensil fue mayor inclusive que la de las mallas.

Ariza y colaboradores (28) implantaron pericardio bovino conservado en glicerina al 98% durante 180 días en un equino como malla biológica para corregir y soportar un defecto incisional creado lateral a la línea alba, y obtuvieron resultados que indican que el material resiste el peso visceral y no desencadena rechazo o contaminación. Por otro lado, Pérez y colaboradores (66) resaltan la importancia de esta membrana conservada en glutaraldehído, como bioprótesis no solo para cirugía cardiovascular, sino también para la reparación de defectos traqueales, de pared torácica y defectos herniarios en pared abdominal, aunque también se reconoce que esta membrana puede calcificarse y desencadenar respuestas inmunológicas de rechazo.

Pericardio equino

Los primeros usos del pericardio equino en cirugía veterinaria reconstructiva fueron realizados en 1990, cuando Ranzani y colaboradores (17) causaron experimentalmente hernias diafragmáticas en caninos y los repararon con fragmentos de pericardio equino conservado en glicerina. Los pacientes que recibieron este tipo de implan-

tes no presentaron o desencadenaron manifestaciones clínicas de enfermedad relacionada a la hernia diafragmática, y el orificio creado para simular la hernia fue completamente obliterado, lo que indujo a otros investigadores como Barros y colaboradores (18) a utilizar este tejido conservado en glicerina, en caninos con úlcera de córnea, cuyos resultados sugieren que el pericardio equino es un medio efectivo y útil en la reparación de lesiones de córnea en perros, aunque recomiendan su uso en lesiones periféricas, en las que no se interfiera con el eje visual, debido a la opacidad propia de esta membrana.

Estudios más recientes, como el realizado por Brun y colaboradores (67), quienes usaron el pericardio equino de forma experimental en la reparación de lesiones en la pared traqueal de caninos, demostraron la viabilidad de este implante, conservado por 11 años en glicerina, puesto que a pesar del prolongado tiempo de conservación, fue capaz de estimular crecimiento de tejido epitelial traqueal.

El pericardio equino conservado en glicerina al 98% también fue implantado en caninos con hernia perineal. Los resultados indicaron que este tejido puede emplearse en herniorrafias perineales, puesto que una vez realizado el procedimiento, ninguno de los pacientes operados presentó recidiva, la cual es una complicación frecuente que se da después de este tipo de patologías quirúrgicas (31).

Cartílago auricular

En caninos, el cartílago auricular empleado de forma experimental para la reparación de alteraciones anatómicas traqueales fue probado por Contesini y colaboradores (68), quienes al evaluar los resultados de su uso concluyeron que este implante es completamente efectivo, y que cuando este se conserva en glicerina al 98% la respuesta inducida por el lecho receptor es menos agresiva. Luego de los anteriores resultados, el mismo autor probó este tejido en la reparación de hendidura palatina (fistula oronasal) en caninos, en los que se realizó un flap por deslizamiento mucoperióstico reforzado con cartílago auricular; con ello se concluyó que la cicatrización fue más acelerada y completa gracias a la membrana empleada en el procedimiento quirúrgico (69).

En felinos, este tejido obtenido de caninos y conservado en glicerina al 98 % mostró resultados favorables al implantarlo en defectos de pared torácica. Esto hace que su uso sea recomendable para corregir fallas en la musculatura de la pared o en la ausencia de segmentos costales (30). El cartílago auricular también ha sido implantado en casos de reparación de lesiones esofágicas en caninos; aquí demostró ser un material de reparación eficiente, puesto que en los pacientes operados no se presentó estenosis o dehiscencia de la suturas, complicaciones frecuentes en la cirugía esofágica (16).

Fascia lata

La fascia lata ha sido empleada en cirugía veterinaria reconstructiva por sus particulares características, principalmente por su alto contenido de colágeno, lo que le confiere un porcentaje de deformación bajo, escasa elasticidad y óptima flexibilidad (70). Esta, obtenida de caninos, conservada en glicerina al 75 % e implantada en pacientes de la misma especie que presentaban hernia perineal, resolvió el defecto a través de herniorrafia con implante, sin complicaciones en los animales sometidos al procedimiento, aún 60 días después de realizada la cirugía (21).

MEDIOS Y MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Las membranas biológicas, a pesar de presentar baja antigenicidad por estar constituidas casi exclusivamente por colágeno (26), inducen rechazos, por lo que para que estas sean utilizadas, deben ser sometidas a procesos que disminuyan tal reacción, tales como la irradiación, el congelamiento, la preservación química o autoclavado, entre otros tratamientos (71). Con estos procedimientos, además, se busca preservar las características del tejido e inhibir el crecimiento bacteriano.

Un gran número de estudios con membranas biológicas conservadas de diferentes maneras han sido realizados con el objetivo de encontrar un medio ideal para preservación. Las características más importantes con las que

debe cumplir una sustancia o un proceso de conservación en una membrana son: mantener la integridad tisular del tejido conservado; atenuar la reacción antigénica; aumentar la resistencia a la tracción; mantener la asepsia del material; tener bajo costo y fácil manipulación (26,52).

Es importante considerar, al respecto de los medios de conservación de los tejidos empleados como implantes, que estos no pretenden mantener la viabilidad celular, puesto que la eficiencia de la cirugía reconstructiva está asociada a la reacción biológica de la reparación y no a la supervivencia de los elementos celulares presentes en el implante (26).

Dentro de los métodos de conservación de las membranas se destaca un importante número de sustancias químicas empleadas con este objetivo, entre las que se reconoce: la glicerina (8), la solución supersaturada de azúcar (72), el glutaraldehído (14,50), la solución hipersaturada de sal (73), entre otros.

Glicerina

La glicerina —también denominada glicerol o propanotriol— al 98 % es la sustancia de conservación de membranas biológicas de mayor uso en medicina veterinaria, debido a sus importantes propiedades, entre las cuales se destaca su alto poder antiséptico, su capacidad en la preservación de la textura, el aumento de la resistencia a la tracción e inalteración de la elasticidad de los tejidos, además de ser un método de conservación simple y poco costoso (8,13,67). Las membranas biológicas que se conservan en glicerina pueden ser mantenidas a temperatura ambiente y deben conservarse por un periodo mínimo de 30 días completamente sumergidas en este medio, antes del procedimiento quirúrgico (26,20,32), tiempo que garantiza el efecto antimicrobiano (53) y la atenuación inmunogénica, y por tanto evita reacciones de rechazo del tejido receptor ante el implante utilizado (74).

Si bien el periodo mínimo en que debe permanecer una membrana en glicerina debe ser de 30 días (32,75), el tiempo máximo que puede durar una membrana sin per-

der sus propiedades o sin contaminarse en este medio ha sido motivo de investigaciones. A este respecto, Rabelo y colaboradores (53) sugieren que las membranas en este medio se mantienen estables en un periodo superior a seis meses y pueden ser conservadas por tiempo aún más prolongado. Por su parte, Brun y colaboradores (67) demostraron la ausencia de crecimiento bacteriano y fúngico durante un periodo de once años, en conservación de pericardio equino, sin pérdida de las propiedades originales de la membrana.

El mecanismo de acción de la glicerina se basa en la deshidratación de los tejidos inmersos, puesto que el glicerol presenta una acentuada hidrofilia, con lo cual se substituye la mayor parte del agua intracelular, sin alterar la concentración iónica de las células, protegiendo la integridad celular (13). Pocas desventajas han sido citadas al respecto del uso de la glicerina. Mota y colaboradores (52) registraron ruptura de membranas plasmáticas de músculo liso intestinal.

Glutaraldehído

El glutaraldehído es un agente antiséptico y desinfectante, perteneciente al grupo de los aldehídos y empleado frecuentemente para estos fines por ser considerado poco irritante y de amplio espectro bactericida (76). Su uso como agente conservante de membranas se conoce desde finales de los años sesenta, cuando Carpentier y colaboradores lo utilizaron en el tratamiento de válvulas heterólogas (77). Químicamente, el glutaraldehído posee uniones cruzadas estables que reaccionan con proteínas como la albúmina, el colágeno y la heparina. Estas uniones cruzadas son reticulados tridimensionales en las que las ramificaciones de las moléculas pueden hacer interacción con diferentes cadenas lineales, y al unirse provocan alteraciones en las propiedades de los polímeros. De esta forma, se reconoce que el glutaraldehído genera uniones cruzadas eficientes química, biológica y térmicamente, que reaccionan de forma relativamente rápida y son capaces de reaccionar con un largo número de grupos aminos viables. Además de eso, los tejidos con uniones cruzadas con esta sustancia retienen propiedades

viscoelásticas del sistema fibrilar del colágeno, por lo cual se acrecienta su viabilidad como bioprótesis (78).

Diferentes concentraciones de glutaraldehído han sido estudiadas con el objetivo de encontrar una ideal para conservar los tejidos, puesto que las concentraciones altas de la sustancia, si bien garantizan la ausencia de microorganismos, son extremadamente tóxicas (79). Santillán y colaboradores (27) observaron que una concentración de glutaraldehído al 0,5 % es efectiva en la conservación de membranas, una vez que al preservar pericardio bovino para la reparación de defectos en la pared toracoabdominal el pericardio conservó sus propiedades y especialmente sus características de resistencia. Otros autores, en cambio, sugieren concentraciones de hasta el 4 %, con lo que muestran conservación efectiva de las estructuras morfológicas del implante en los aspectos macro- y microscópicos, además de garantizar baja antigenicidad y eficacia antiséptica cuando las membranas se mantienen en inmersión por 30 días antes de implantarse. Como principal desventaja, se encuentra el hecho de que el glutaraldehído presenta calcificación tardía posimplante de tejidos (80,81).

Solución hipersaturada de azúcar

En busca de nuevos medios de conservación con características deshidratantes, antisépticas y antigénicas, fue probada la solución hipersaturada de azúcar al 300 % y se concluyó que este medio mantiene la integridad celular y fibrosa de los tejidos; esto muestra resultados óptimos en peritoneo bovino, de forma semejante a los resultados encontrados en membranas conservadas en glicerina (82). Investigaciones como la realizada por Gonçalves (83), que tuvo como objetivo comparar los resultados clínicos de la utilización de corneas previamente conservadas en solución hipersaturada de azúcar al 300 % y glicerina al 98 % en queratoplastias lamelares homólogas, permiten concluir que los dos medios se prestan para la conservación de corneas de caninos con resultados clínicos semejantes y satisfactorios. El poder bactericida de las soluciones de azúcar se consigue cuando se prepara la solución en concentraciones iguales o superiores al

250% y cuando los tejidos se conservan por un periodo mínimo de 45 días (52).

Solución hipersaturada de sal

La solución hipersaturada de sal como medio de conservación de membranas ha sido empleada en proporción de 1,5 g de sal comercial por 1 ml de agua tridestilada, solución que ha demostrado efectividad antiséptica ideal en los tejidos, además de que mantiene las características estructurales de estos (73). Los tejidos conservados en sal mantienen la maleabilidad incluso antes del periodo de hidratación; tal característica facilita la manipulación del implante durante el procedimiento quirúrgico. Reacciones de tipo inmune o rechazo del implante no han sido detectadas, lo cual indica que la solución hipersaturada de sal posee función antiinmunogénica como otros medios de conservación (73,84).

Miel

La miel ha sido utilizada desde la antigüedad como sustancia capaz de conservar tejidos debido a sus propiedades farmacológicas: efectos antimicrobianos, antiinflamatorios y antipiréticos (85). Subrahmanyam (86) estudió la miel como un medio de conservación de piel para injertos por un periodo mínimo de dos semanas. Una vez analizados los tejidos conservados, no fueron observadas señales de autólisis o alteraciones histológicas. Exámenes de laboratorio realizados en esos injertos confirmaron la ausencia de microorganismos.

Solución de polivinilpirrolidona

La solución de polivinilpirrolidona al 5% como conservante de tejidos posee excelente acción antimicrobiana. Las membranas mantenidas por 45 días a temperatura ambiente demuestran la veracidad de estas afirmaciones; aunque también se ha encontrado destrucción de núcleos celulares y extravasamiento de la cromatina de los tejidos conservados, resultados que no convierten esta solución en un medio de conservación ideal (52).

Congelación

Reyes (75), mediante el empleo de la técnica de conservación por congelación, obtuvo resultados semejantes a los obtenidos con membranas preparadas en fresco. Lo mismo ocurrió cuando la congelación fue comparada con la preservación en glicerina, ya que al evaluar la resistencia a la ruptura, extensión, fuerza tensil máxima y coeficiente de elasticidad de las partes no fueron encontradas diferencias significativas entre las técnicas.

Los medios de criopreservación, como Eagle modificado de Dulbecco, descrito por Lee y Tseng (87), y DMSO 12% enriquecido, descrito por Shimazaki, Yang y Tsubota (88), ambos congelados a 80 °C, fueron utilizados con éxito para trasplantes de córnea. Mota y colaboradores (52) emplearon como método de conservación de membranas biológicas la congelación a -16°C por 45 días con resultados poco alentadores, puesto que a pesar de que a esta temperatura no hubo crecimiento de microorganismos, el análisis histológico mostró lisis celular con acentuado aumento del espacio intersticial en los tejidos conservados.

IMPLANTE DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

El proceso de conservación de una membrana biológica, dependiendo del medio empleado, puede durar aproximadamente entre 30 y 45 días mínimo (52,75). Debido a que la mayor parte de sustancias empleadas para la preservación de las membranas son deshidratantes, posterior a los 30 o 45 días y cuando se va a realizar el implante, los tejidos deben ser rehidratados por al menos entre 10 y 25 minutos, o incluso hasta 1 hora, en solución salina estéril, dependiendo de la solución conservante. Este proceso, además de hidratar, retira los excesos del conservante y facilita la manipulación de la membrana durante el procedimiento quirúrgico (30,67). Una vez rehidratadas las membranas y establecido el diámetro del defecto anatómico que se va a corregir, se fragmentan con instrumental estéril (53).

El proceso de implante es sencillo y difiere de acuerdo con el área por corregir y el tipo de membrana que se va a utilizar; en la mayor parte de los casos se utiliza sutura no absorbible de nylon en patrón de puntos simples separados con resultados óptimos (50,56). La escogencia de sutura no absorbible para los implantes se basa en la baja reacción tisular del material, y por tanto menor inflamación e interferencia en el proceso de reparación (89). Pero a pesar de estas afirmaciones, algunos estudios en los que los implantes se suturaron con material absorbible y patrón continuo sugieren buena respuesta del receptor y el implante (90).

Además de las suturas, las membranas biológicas pueden ser implantadas con ayuda de adhesivos sintéticos como el cianocrilato, como fue registrado por Aceto y colaboradores (16), quienes emplearon membrana amniótica en defectos de piel fijada con cianocrilato a la piel íntegra a 1,5 cm distante de los bordes de la herida.

Reacción tisular ante un implante de membranas biológicas

Cuando se implanta una membrana en un procedimiento quirúrgico se inicia una lesión tisular obligatoria que continúa hasta el posoperatorio de los pacientes y que predispone a la ruptura de los vasos sanguíneos con concomitante liberación de los componentes de la sangre. Las alteraciones en el flujo vascular acontecen y así se inicia la respuesta inflamatoria aguda, responsable por el escape de células sanguíneas, fluidos y proteínas desde el componente vascular, con lo que se perturba el mecanismo homeostático y se desencadena la cascada celular propia del proceso de reparación (91).

Una matriz provisional es formada en el sitio del implante inmediatamente después del daño del tejido vascular. Tal matriz está compuesta por células inflamatorias, fibrina y células endoteliales. Mitógenos, quemoquinas, citoquinas y factores de crecimiento son liberados en la matriz provisional e influyen en la cicatrización (92). Las células inflamatorias: neutrófilos y macrófagos que aparecen durante el proceso de inflamación aguda fagocitan microbios y materiales extraños (93). La fagocitosis y

degradación del biomaterial empleado en los implantes puede no ocurrir y es altamente dependiente de las propiedades de los biomateriales.

Generalmente, los biomateriales no son fagocitados por macrófagos debido a la disparidad de su tamaño. Ciertos biomateriales pueden ser fagocitados si son recubiertos por sustancias naturales, tales como opsoninas. Las opsoninas son reconocidas por el tejido receptor y provocan degradación, y aunque este proceso de degradación puede no envolver fagocitosis del biomaterial, resulta en la liberación de productos de los leucocitos en un intento por degradar el biomaterial (94). Los neutrófilos liberan enzimas, y la cantidad de estas depende del tamaño de las partículas del biomaterial; esto sugiere que la activación de respuesta inflamatoria en el tejido depende del tamaño y del material del implante, y así se define si es fagocitable o no fagocitable. Una persistente inflamación en el sitio de implante resulta en una inflamación crónica, en la que los linfocitos, células plasmáticas, monocitos y macrófagos están presentes.

Las propiedades físicas y químicas del biomaterial predisponen al proceso de inflamación crónica. Los macrófagos son importantes en la inflamación crónica porque procesan y presentan el antígeno a las células inmunocompetentes, con lo cual se inician las reacciones inmunes (92). La formación del tejido de granulación es el sello distintivo del proceso de curación o reparación. El inicio de la formación del tejido de granulación depende del sitio y del tamaño de la herida y su formación puede observarse dentro de tres a cinco días después del implante. Las reacciones de tipo cuerpo extraño son caracterizadas por células gigantes y componentes del tejido de granulación. Las propiedades físicas y químicas de los biomateriales usados determinan la reacción de rechazo (95). La reacción de cuerpo extraño es considerada normal en el implante de biomateriales.

Al inicio, cuando se implanta una membrana biológica, ocurre, como en todos los implantes, migración de células inflamatorias, edema y formación de tejido de granulación en aproximadamente 60 días como fue registrado por Ranzani (17), quien también demostró que estas al-

teraciones disminuyen de intensidad progresivamente y el implante es sustituido por tejido fibroso joven, lo que origina una nueva membrana compuesta por colágeno, vasos e infiltrado celular.

Algunos estudios desarrollados con pericardio equino como membrana biológica demostraron que el proceso inflamatorio puede caracterizarse como crónico y moderado (96). Durante la respuesta inflamatoria crónica al implante, los productos de adherencia de células inflamatorias pueden ser generados y perjudicar el implante o reaccionar con el biomaterial y generar catabolitos tóxicos (97), situación que no acontece con una membrana como el pericardio homólogo, el cual, una vez empleado por Bellanzini y colaboradores (98) en la reparación de intestino grueso de equinos, recubrió las lesiones sin presencia de adherencias de otras estructuras de la cavidad abdominal, y fue recubierto e incorporado al organismo ocho semanas postimplantación, con presencia de discreto tejido cicatricial. Los autores registran que a la quinta semana después de la implantación fue difícil la diferenciación entre el tejido fibroso de cicatrización y el implante.

Existe evidencia de la frecuencia de un proceso inflamatorio crónico en las membranas implantadas. Si bien no han mostrado reacciones de rechazo, denotan una desventaja cuando estos tejidos se comparan con bioimplantes sintéticos. Como prueba de esto, Filho y colaboradores (99) compararon las reacciones tisulares de un implante de politetrafluoroetileno expandido (PTFE-E), cuyo origen es sintético, con las de un implante de pericardio bovino en un modelo murino al que se le ocasionaron heridas en piel y tejido subcutáneo; al evaluar en cada tratamiento el proceso inflamatorio y de reparación, la inflamación aguda de los tejidos que recibieron el implante de PTFE-E tuvo corta duración y el proceso de reparación fue más rápido que en el tejido implantado con pericardio bovino. Aquí se hizo evidente una reacción inflamatoria crónica por un periodo mayor a 30 días, aunque en ninguno de los dos materiales hubo señales de rechazo al implante.

Los hallazgos compatibles con rechazo de los implantes de membranas biológicas son atribuidos, más que a los

tejidos, a las sustancias conservantes o técnicas de lavado durante el proceso de las membranas (100). Cabe mencionar también particularmente la membrana amniótica, puesto que posee varios factores solubles, proteínas antiangiogénicas y antiinflamatorias e inhibidores naturales para varias proteasas. Estos factores propician un microambiente libre de inflamación, ideal para un proceso de reparación (101). Las membranas biológicas son ricas en colágeno, principalmente de tipo I, el cual posee diferentes ventajas, como hemostasia, quimiotaxis para fibroblastos, débil inmunogenicidad y facilidad de manipulación (102), características que hacen que se presenten pocos efectos indeseables de rechazo a los implantes de este tipo de material.

Complicaciones frecuentes de los implantes de membranas biológicas

Pese a que son pocos los registros de complicaciones generadas en los tejidos a partir de los implantes de membranas biológicas, se reconoce que en casos excepcionales su uso se recomienda, más que como implante, como vendaje oclusivo por no estimular la aparición de tejido de granulación óptimo para la reparación tisular (17).

Quitzan y colaboradores (8), al comparar el pericardio bovino con una malla comercial de poliéster en la reconstrucción de defectos de pared abdominal, encontró animales que, si bien fueron pocos, desarrollaron adherencias del omento al implante de pericardio bovino. La malla de poliéster fue considerablemente más adherente incluso a vísceras abdominales. El pericardio bovino, empleado sobre todo como implante en cirugía cardiovascular, considerado una bioprótesis fácil de obtener, de fácil preparación, conservación, transporte, bajo costo y que por lo general tiene buenos resultados a largo plazo, puede presentar calcificación postimplante; aunque estos hallazgos son asociados al medio de conservación principalmente cuando se emplea glutaraldehído y a la edad del paciente, puesto que las calcificaciones se presentaron en adultos (66).

La presencia de coágulos, las secreciones purulentas y serosanguinolentas, la lisis de las membranas y la frag-

mentación o desprendimiento de membrana amniótica fueron encontradas en caninos después de un implante experimental en heridas dérmicas. Estos resultados llevaron a Paulo (51) a concluir que esta membrana biológica conservada en glicerina al 98 %, empleada como implante, no promueve la aceleración de la cicatrización en los caninos y no impide el desarrollo de microorganismos en estas heridas.

CONCLUSIONES

Las membranas biológicas son bioimplantes útiles en cirugía veterinaria reconstructiva y su uso debe ser considerado, puesto que además de ofrecer una completa oclusión de las heridas o alteraciones, proporcionan un tejido de sostén requerido en la reparación tisular, sin reacción antigénica y con propiedades antisépticas que las convierten en los implantes ideales cuando se busca recuperar la morfología y función de un tejido u órgano.

Diferentes defectos anatómicos en animales pueden ser resueltos con la ayuda de membranas biológicas, y las experiencias clínicas de estos casos sirven de referencia para su uso; por tanto, el registro de estas situaciones son el mayor fundamento para emplearlos con mayor frecuencia en medicina veterinaria.

REFERENCIAS

1. Degner DA. Facial reconstructive surgery. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2007;22(2):82-8.
2. Scheffer JP, Atallah FA, Gomes C, Estupiñan OFT, Silva SJQ, Silva TIR, et al. Cirugía reconstructiva no tratamento de feridas traumáticas em pequenos animais. *Rev Bras Med Vet.* 2013;35(1):70-8.
3. Mélega JM, Reiff ABM. Introdução à cirurgia plástica. En: Mélega JM, editor. *Cirurgia plástica – fundamentos e arte – princípios gerais.* Rio de Janeiro: Medsi; 2002.
4. Jeff J, Kim BS, Gregory RD, Evans M. Applications of biomaterials in plastic surgery. *Clin Plastic Surg.* 2012;39(4):359-76.
5. Urist MR. Bone transplants and implants. En: *Fundamental and clinical bone physiology.* Philadelphia: Lippincott; 1980.
6. Burwell RG. The fate of bone grafts En: Apley AG, editor. *Recent advances in orthopaedics.* London: Churchill Livingstone; 1969.
7. Stevenson. Enxertos ósseos. En: Slatter D. *Manual de cirurgia de pequenos animais.* Sao Paulo: Manole; 1998.
8. Quitzan JG, Rahal SC, Crocci AJ. Comparação entre pericárdio bovino preservado em glicerina e malha de poliéster no reparo de falhas da parede abdominal em ratos. *Acta Cir Bras.* 2003;18(4):297-301.
9. Rahal SC, Amaral MSP, Teixeira EMS, Caporali EHG, Hette K. Enxertos cutâneos. Revisão. *Clínica Veterinária.* 2004;49:34-42.
10. Fitch R, Kerwin S, Newman-Gauge H, Sinibaldi KR. Bone autografts and allografts in dogs. *Compend Contin Educ Vet.* 1997;19(5):558-78.
11. de Freitas SH, Sampaio Dória RG, de Souza Mendonça F, Evêncio Neto J, de Camargo M. Aspecto radiológico de heteroenxerto ósseo cortical fragmentado na reparação de falhas ósseas em coelhos. *R Bras Ci Vet.* 2008;15(3):107-10.
12. Scolla Vulcani A, da Graça Macoris D, de Guzzi AM. Membranas biológicas homólogas preservadas em solução alcalina seguida de liofilização, glicerina a 98 % e por liofilização para implantação em equinos. *Ciênc Rural.* 2008;38(5):1329-34.
13. Pigossi N. Implantação de dura-máter homogênea conservada em glicerina: estudo experimental em cães. *Arq Cir Clin Exp.* 1964;27:213-47.
14. Samperio CG, García JV, Cardenas JDF, Corona MAG. Bioprótesis de pericardio bovino tratado con glutaraldehído (PBTG) en la reconstrucción de la pared abdominal. *Cirurgía y Cirujanos.* 2002;70(4):257-66.
15. Pigatto JAT, Pippi NL, Marchionatti A, Contensini EA, Graça DL, de Godoy CLB, et al. Esofagoplastia cervical em caninos com enxerto homólogo de cartilagem conchal preservada em glicerina. *Ciênc Rural.* 1998;28(4):617-21.
16. Aceto ML, Coelho MCOC, Monteiro VLC, Carneiro-Leão AMA, Melo-Júnior MM. Membrana amniótica e pericárdio canino como curativos biológicos na

- preparação do leito receptor para enxertia cutânea autógena. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2007;59(2):358-62.
17. Ranzani JJT, et al. Substituição de segmento da porção muscular diafragmática de cão por pericardio de equino conservado em glicerina: Estudo experimental. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 1990;27(1):65-73.
 18. Barros PSM, Safatle MW, Rigueiro M. Uso do pericárdio de equino conservado em glicerina como enxerto penetrante da córnea de cães Estudo experimental. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 1997;34(3):138-41.
 19. Stellman UJP, Silva AA, Souza BG, Hess TM, Aguiar GC, Santos E. Utilização de pericárdio bovino como reforço da rafia do peritônio no tratamento cirúrgico de eventração em equino: relato de caso. *Rev Cient Elet Med Vet.* 2010;(14):112-16.
 20. Featherstone HJ, Sansom J, Heinrich CL. The use of porcine small intestinal submucosa in ten cases of feline corneal diseases. *Vet Ophthalmol.* 2001;4(2):147-53.
 21. Semiglia GG, Izquierdo DF, Zunino JH. Utilización de fascia lata alogénica para la herniorrafia perineal canina: comunicaci3n de 7 casos clínicos. *Arch Med Vet.* 2011;43(1):59-64.
 22. Imaguti P, Borges Texeira R, Ferrari Padovani C. Ruptura do ligamento cruzado em cães. Estudo retrospectivo da reconstituição com fascia lata. *Ciênc Rural.* 1998;28(4):609-15.
 23. Ferreira ML, Schanaider A, Silva PC, de Abreu AV, Ferreira Nicolau Costa A, Meira Braga J, et al. Estudo da técnica da sindesmoplastia extra-articular com fascia lata autógena. *Rev Col Bras Cir.* 2009;36(2):161-6.
 24. Oliveira VA, Alvarenga J. Membrana amniótica preservada em glicerina no reparo de feridas cutâneas de membros locomotores de equinos. *Ciênc Rural.* 1998;28(4):623-8.
 25. Pontes KCS. Membrana amniótica bovina, preservada em glicerina, no tratamento de úlcera de córnea em um cão e de sequestro corneal em dois felinos – Relato de casos. *Revista Clínica Veterinária.* 2010;(85):88-96.
 26. Alvarenga J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. En: Daleck CR, Mukay LS, Baptista LC. *Tópicos em cirurgia de cães e gatos.* Jaboticabal: FUNEP-UNESP; 1992.
 27. Santillán DP, Jasso VR, Sotrés VA, Olmos R, Arreola JL, García D, et al. Reparación de defectos de pared tóracoabdominal de perros con bioprótesis de pericardio bovino. *Rev Invest Clin.* 1995;47(6):439-46.
 28. Ariza JM, Barrero J, Mejía G. Pericardio bovino preservado en glicerina, como malla biológica en cirugía equina. *Rev Colom Cienc Pecua.* 2011;24(3):396-400.
 29. Chehuen Neto JA, Nigro AJT, Belmonte Netto L, Goldenberg S. Restauração traqueal com enxerto cartilaginoso autólogo de pavilhão auricular: estudo experimental em coelhos. *Acta Cir Bras.* 1991;6(4):169-76.
 30. Rappeti JC, Pippi NL, Contesini EA, Lemos Pinto ST, de Lima Alves FSD, Lücke Stigger A, et al. Reconstituição experimental da parede torácica de gatos com implante heterógeno de cartilagem auricular conservada em glicerina a 98 %. *Ciênc Rural.* 2003; 33(6):1089-1094.
 31. López JE, Guaimás Moya L, Báez AD, Lockett MB, Maidana R, López E. Tratamiento quirúrgico de hernias perineales en caninos mediante el uso de pericardio equino conservado en glicerina: Hernia perineal del perro. *Rev Vet.* 2007;18(1):3-8.
 32. Daleck CR, Daleck CLM, Alessi AC, Padilha Filho JG, Costa Neto M. Substituição de um retalho diafragmático de cão por peritônio de bovino conservado em glicerina: estudo experimental. *Ars Vet.* 1988;4(1):53-61.
 33. Daleck CR, Neto JMC, Alessi AC, Vicenti FAM, Fantinatti AP, Francisco MMS, et al. Reparação cirúrgica da pars musculares do diafragma por ligamento nugal xenólogo conservado em glicerina a 98%: estudo experimental em cães (*canis familiaris*- Linnaeus-1758). [Resumos]. Documento procedente del Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária; 2000; Goiania. p. 103.
 34. Stoll MR, Cook JL, Pope ER, Carson WL, Kreeger JM. The use of porcine small intestinal submucosa as a biomaterial for perineal herniorrhaphy in the dog. *Vet Surg.* 2002;31(4):379-90.
 35. Ji-Young N, Kibbeum S, Sokho K, Hae-Beom L, Jae-Kyun K, Jae-Hun K, et al. Evaluation of porcine xenograft in collateral ligament reconstruction in beagle dogs. *Res Vet Sci.* 2014;97(3):605-10.
 36. Gangwar AK, Kumar V, Mathew DD, Ahamad RA, Saxena CA, Kumar N. Acellular dermal matrix for surgical repair of ventral hernia in horses. *J Equine Vet Sci.* 2013;33(4):238-43.

37. Wiemer P, Gruys E, van Hoeck B. Study of seven different types of grafts for jugular vein transplantation in the horse. *Res Vet Sci.* 2005;79(3):211-17.
38. Lemoy MJ, Summers L, Colagross-Schouten A. Clinical allograft of a calcaneal tendon in a rhesus macaque (*Macaca mulatta*). *Am Assoc Lab Anim Sci.* 2014;53(5):523-527.
39. Lee AJ, Chung WH, Kim DH, Lee KP, Suh HJ, Do SH, et al. Use of canine small intestinal submucosa allograft for treating perineal hernias in two dogs. *J Vet Sci.* 2012;13(3):327-30.
40. Monteros AE, Rodríguez FA, Thomas PH, Guisado FR. Tejido conectivo. En: *Tratado de histología veterinaria* Barcelona: Masson; 2004.
41. Ayad S, Boot-Handford R, Hunpries MS, Kadler KE, Shuttlewirth A. *The extracellular matrix.* 2a ed. Londres: Academic Press; 1996.
42. Dziejzig-Gocławska A. Aplicación de la radiación ionizante para esterilizar aloinjertos de tejido conectivo. En: *Radiación y operación de banco de tejidos* Perú: Printing Services AC; 2002.
43. Anderson JL, Ledet T, Hager H, Josephsen K, Ehlers N. The influence of corneal stromal matrix proteins on the migration of human corneal fibroblasts. *Exp Eye Res.* 2002;71(1):33-43.
44. Ronca F, Palmieri L, Panicucci P, Ronca G. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis Cartilage.* 1998;6(Suppl A):14-21.
45. Batista LC, Daleck CR, Shimano AC, Alessi AC, Abrahão MS. Estudo comparativo da resistência à tração do peritônio (bovino, equino, suíno e canino) a fresco e conservado em glicerina. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 1996;33(supl):305-12.
46. Franco D, Goncalves F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. *Rev Col Bras Cir.* 2008;35(3):203-6.
47. Seullner Brandão CV, Mint BW, Sousa Rocha N, Cação Pereira GJ, Tilton Ranzani JJ, Mottas T. Avaliação macro e microscópica da reconstituição da cápsul articular utilizando pericárdio bovino na luxação coxofemoral experimental em cães. *Veto e Zootec.* 2006;13(1):73-83.
48. Guimarães GC, Scavone ARF, Machado MR, Cruz Cd, Capalbo AC, Santos ALQ. Avaliação histológica de membranas biológicas bovinas conservadas em glicerina e a fresco. *Biosci J.* 2007;23(3):120-7.
49. Andrade AL, Laus JL, Figueiredo F, Batista CM. The use of preserved equine renal capsule to repair lamellar corneal lesions in normal dogs. *Vet Ophthalmol.* 1999;2(2):79-82.
50. Silva LAF, Franco LG, Menezes LB, Moura VMDB, Bernardes KM, Souza MA. Hernioplastia experimental em coelhos por meio de cartilagem auricular bovina conservada em glutaraldeído. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2009;61(3):606-12.
51. Paulo NM. Tratamento de feridas experimentais do cão utilizando a membrana amiótica de equino. *R Un Alfenas.* 1998;4:7-10.
52. Mota FCD, Eurides D, Freitas PMC, Beletti E, Mastrantonio EC, Shimizu BJ, et al. Análise morfológica e microbiológica utilizando-se diferentes métodos de preservação sobre a camada muscular do intestino delgado de cães. *Ciênc Anim Bras.* 2003;4(2):117-23.
53. Rabelo RE, Tabares GA, Paulo NM, Franco da Silva LA, Damasceno AD, Andrade MA, et al. Características físicas e microbiológicas do centro tendíneo diafragmático bovino conservado em glicerina a 98 % e no glutaraldeído a 4 %. *Ciênc Anim Bras.* 2004;5(4):229-38.
54. Marinho FLP. Uso da membrana amniótica xenóloga, preservada em glicerina ou criopreservada, após úlceras experimentais em coelhos. Avaliação clínica e histomorfométrica [tesis de maestría]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2006.
55. Woo HM, et al. Effects of amniotic membrane on epithelial wound healing and stromal remodeling after excimer laser keratectomy in rabbit cornea. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(3):345-9.
56. Kim JC, Tseng S. Transplantation of preserved human amniotic membrana for surface reconstruction in severely damage rabbit corneas. *Cornea.* 1995;14(5):473-84.
57. Davids JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J.* 1910;15:307.
58. Stern M. The grafting of preserved amniotic membrane to burned and ulcerated surfaces, substituting skin grafts. *JAMA.* 1913;60:973.
59. Sabella N. Use of the fetal membrana in skin grafting. *Med Rec NY.* 1913;83:478.

60. De Roth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol*. 1940;23:522-5.
61. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Bra J Ophthalmol*. 1999;83(4):399-402.
62. Dua HS, et al. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. 2004;49(1):51-77.
63. Barros P, Safatle A, Godoy C, MS S, Barros L, Brooks D. Amniotic membrane transplantation for the reconstruction of the ocular surface in three cases. *Vet Ophthalmol*. 2005;8(3):189-92.
64. Leite Duarte I. Membrana amniótica como curativo biológico na cicatrização de feridas infectadas: estudo experimental em coelhos [tesis de maestría]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.
65. Rendón J, Bustamante J, Zapata J, Medina S. Uso de pericardio bovino para la corrección de cardiopatías congénitas. *Rev Col Cardiol*. 2007;14(4):247-52.
66. Pérez Covarrubias D, Sotres Veja A, Jasso Victoria R, Olmos Zúñiga J, Villalba Caloca J, Santibáñez Salgado J, et al. Uso del pericardio bovino tratado con glutaraldehído. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2005;18(3):224-9.
67. Brun M, Pigatto J, Driemeier D, Oliveira L, Beck C, Aguiar E, et al. Traqueoplastia em cães com pericardio equino conservado em glicerina por um período de 11 anos. *Revista da FZVA, Uruguaiana*. 2002;9(1):133-42.
68. Contesini E, Seabra Salles M, Pigatto J, Pippi N, Raiser A. Reparação traqueal em cães. Transplante autólogo vs implante homogêneo conservado em glicerina a 98 % de cartilagem de pino. *Ciênc Rural*. 2001;31(4):633-7.
69. Contesini E, Pippi N, de Castro C, Veloso M, da Costa Leme M, Raiser A, et al. Aspectos clínicos e macroscópicos da palatoplastia imediata com implante de cartilagem da pino articular, conservada em glicerina a 98 %, após indução experimental de fenda palatina em cães. *Ciênc Rural*. 2001;31(4):103-8.
70. Brendolan A, Rezende C, Pereira M. Propriedades biomecânicas da fâscia lata e do ligamento cruzado cranial de cães. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2001;53(1):27-36.
71. Johnson A, Shokry M, Stein L. Preliminary study of ethylene oxide sterilization of full-thickness cortical allografts used in segmental femoral fracture repair. *Am J Vet Res*. 1985;46(5):1050-6.
72. Mazzanti A, Raiser A, Pippi N, Alves A, Faria R, Alievi M, et al. Hernioplastia diafragmática em cão com pericardio bovino conservado em solução supersaturada de açúcar. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2003;55(6):677-84.
73. Brun M, Pippi N, Driemeier D, Contesini E, Beck C, Cunha O, et al. Solução hiperstaurada de sal como conservante de pericardio canino utilizado na reparação do músculo reto abdominal de ratos Wistar. *Ciênc Rural*. 2002;32(6):1019-25.
74. Stainki DR, Alves GES, Vasconcelos AC, Barbosa MP, Oliveira HP. Enxertos vasculares homólogos e heterólogos conservados em glicerina na fleboplastia da jugular em equinos. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2005;57(1):18-26.
75. Reyes EEF. Testes físicos comparativos de membranas biológicas preservadas em glicerina, congeladas e a fresco [tesis de maestría]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1993.
76. Cardenas-Lailson LE, Glavánmontaño A, Malagón-Hidalgo HO. Modelo experimental del uso de pericardio de bovino tratado con glutaraldehído, comparado con malla de silicón para el tratamiento de los defectos congénitos de la pared abdominal. *Cir Gen*. 1997;19(2):116-9.
77. Carpentier A, Lemaigre G, Robert L, Carpentier S, Dubost C. Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1969;58(4):468-83.
78. Jayakrishnan A, Jameela S. Glutaraldehyde as a fixative in bioprotheses and drug delivery matrices. *Biomaterials*. 1996;17(5):471-84.
79. Werley M, Ballantyne B, Neptum D, Losco P. Four-week repeated skin contact study with glutaraldehyde in rats. *Cutan Ocul Toxicol*. 1996;15(2):179-93.
80. Jorge-Herrero E, Fernández P, Gutiérrez M, Castillo-Olivares JL. Study of the calcification of bovine pericardium: Analysis of implication of lipids and proteinoglycans. *Biomaterials*. 1991;12(7):683-9.
81. Gong G, Ling Z, Seifter E, Factor SM, Frater RW. Aldehyde tanning: The villain in bioprosthetic calcification. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1991;15(6):288-99.
82. Bariani Junior A, Crisci A, Machado M, Guimarães G. Análise morfológica de membranas biológicas em diferentes meios de conservação. Documento procedente

- del 15^a Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP; 2007, Ribeirão Preto.
83. Gonçalves GF. Ceratoplastias lamelar homóloga em cão com conservação em solução supersaturada de açúcar ou glicerina. [Tesis de maestría]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2000.
 84. Brun MV, Pippi NL, Driemeier D, Contesini EA, Beck CAC, da Cunha O, et al. Solução hipersaturada de sal ou de glicerina a 98 % como conservantes de centros frênicos caninos utilizados na reparação de defeitos musculares em ratos wistar. *Ciênc Rural*. 2004;34(1):147-53.
 85. Frassetto G. Aspectos biomecânicos, bacteriológicos e micológicos de diáfises femorais caninas conservadas em glicerina a 98 % ou mel Santa Maria [tesis doctoral]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2007.
 86. Subrahmanyam M. Storage of skin grafts in honey. *Lancet*. 1993;341(8836):63-4.
 87. Lee SH, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol*. 1997;123(3):303-12.
 88. Shimazaki J, Yang HY, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology*. 1997;104(12): 2068-76.
 89. Ramos E. Estudo da biocompatibilidade da tela de polipropileno e da submucosa intestinal de porco na correção de defeitos criados na parede abdominal de cães-estudo comparativo [tesis de maestría]. Universidade Federal do Paraná; 2002.
 90. Whitley R, Gilger BC. Diseases of the canine cornea and sclera. En Gelatt KN. *Veterinary ophthalmology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. p. 635-74.
 91. Clark RA, Henson PM. The molecular and cellular biology of wound repair. 2a ed. Nueva York: Springer; 1996.
 92. Tang L. Mechanisms of fibrinogen domains: biomaterial interactions. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1998;9(12):1257-66.
 93. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins basic pathology*. 8a ed. Philadelphia: Elsevier; 2013.
 94. Katzenmeyer KN, Bryers JD. Multivalent artificial opsonin for the recognition and phagocytosis of gram-positive bacteria by human phagocytes. *Biomaterials*. 2011;32(16):4042-51.
 95. Anderson JM, Rodriguez A, Chang D. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol*. 2008;20(2):88-100.
 96. Greca F, Noronha L, Afonso da Costa FD, Souza Filho ZA, Soccol AT, Feres AN, et al. Estudo comparativo da biocompatibilidade da mucosa intestinal porcina e pericárdio bovino utilizados como enxertos na veia cava de cães. *Act Cir Bras*. 2005;20(4):317-322.
 97. Zhao X, Courtney J. Influence on blood of plasticized polyvinyl chloride: significance of the plasticizer. *Artif Organs*. 1999;23(1):104-7.
 98. Bellenzani M, Baccarin R, Carrara C, Manzan R. Evaluation of the healing of surgically created small colon serosal lesions in horses, treated by homologous pericardium implantation: an experimental study. *J Equine Vet Sci*. 2004;24(12):535-9.
 99. Filho DH, Marques A, Kafajian-Haddad AP, Zveibel DK. Estudo comparativo das reações teciduais ao implante de pericárdio bovino e a inclusão de politetrafluoretileno expandido em ratos. *Acta Cir Bras*. 2004;19(2):131-5.
 100. Pinto TJA, Saito T, Glerean Á. Biocompatibilidade de materiais empregados na confecção de próteses cardiovasculares: comparação entre pericárdio bovino e Dacron. *Rev Saúde Pública*. 1993;27(3):185-9.
 101. Grueterich M, Espana E, Tseng S. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv Ophthalmol*. 2003;48(6):631-46.
 102. Hao H, Lin L, Sheu M. Characterization of collagen isolation and application of collagen gel as drug carrier. *J Contr Rel*. 1997;44(2-3):103-12.