

UTILIZAÇÃO DE PELE DE TILÁPIA DO NILO E RÃ-TOURO EM HERNIOPLÁSTIA DE PAREDE ABDOMINAL DE RATTUS NORVEGICUS, VARIEDADE WISTAR.

USE OF NILE TILAPIA AND BULLFROG SKIN IN ABDOMINAL WALL HERNIOPLASTY OF RATTUS NORVEGICUS, WISTAR VARIETY.

Siria da Fonseca Jorge¹, Jorge Carlos Dias de Sousa Filho², Carolina Seabra da Costa³, Richardson da Paz Coelho⁴, Matheus Fernandes de Souza⁵, Lycia de Brito Gitirana⁶, Marcelo Abidu Figueiredo⁷

¹ siriavet@gmail.com. Docente do curso de graduação em Medicina Veterinária, UNIFESO.

² biojorge96@gmail.com. Egresso do curso de graduação em Medicina Veterinária, UNIFESO.

³ carolinaseabra@outlook.com. Discente do curso de graduação em Medicina Veterinária, UNIFESO.

⁴ richardson.nvfriburgo@hotmail.com. Discente do curso de graduação em Medicina Veterinária, UNIFESO.

⁵ matheussouza@yahoo.com.br. Discente do curso de graduação em Medicina, UNIFESO.

⁶ lyciabg@histo.ufrj.br. Laboratório de Histologia Integrativa, CCS, UFRJ.

⁷ marceloabidu@gmail.com. Área de Anatomia Veterinária. Instituto de Veterinária, UFRRJ.

Resumo

A pesquisa de novos biomateriais é uma área crescente na medicina. A utilização de biomateriais em correções herniárias é uma busca constante dos cirurgiões em todo mundo. O tipo de material utilizado cirurgicamente, sua estrutura e porosidade, influenciam diretamente na eficiência do implante, destaca-se dentre os biomateriais biológicos as peles de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e Rã-Touro (*Lithobates catesbeianus*), por apresentarem características capazes de estimular naturalmente o crescimento do tecido do próprio paciente. Estes demonstram-se produtos de descarte pós-abate em produções comerciais. O presente estudo tem como objetivo aprimorar a utilização de biomateriais para hernioplastias. Foram utilizados 24 ratos Wistar, divididos quanto ao material de implante, pele de Tilápia do Nilo e pele de Rã-touro, e subdivididos quanto ao período de eutanásia em 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório. No período pós-operatório ocorreram avaliações clínicas e por termografia infravermelha, e, após eutanásia, avaliação macroscópica. Os resultados demonstraram alterações clínicas brandas, reação inflamatória aguda até o sétimo dia de pós-operatório, formação de neovascularização a partir de 15 dias de pós-operatório, de acordo com os métodos de análise utilizados. As peles de Tilápia do Nilo e Rã-touro, demonstraram ser biocompatíveis até os 90 dias de pós-operatório.

Palavras-chave: Biomateriais. Defeitos herniários. Pele de Tilápia do Nilo. Pele de Rã-touro.

ABSTRACT

The search for new biomaterials is a growing area in medicine. The use of biomaterials in hernia repairs is a constant search of surgeons around the world. The type of material used surgically, its structure and porosity, directly influence the efficiency of the implant, the skins of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) stand out among the biological materials, as they present characteristics capable of naturally stimulating the patient's own tissue growth. These are demonstrated post-slaughter disposal products in commercial productions. This study aims to improve the use of biomaterials for hernioplasties. Twenty-four Wistar rats were used, divided according to implant material, Nile Tilapia skin, and bullfrog skin, and subdivided according to the period of euthanasia at 7, 15, 30, and 90 days after surgery. In the postoperative period, clinical evaluations and infrared thermography were performed, and, after euthanasia, macroscopic evaluation. The results

showed mild clinical changes, acute inflammatory reaction until the seventh day after surgery, formation of neovascularization from 15 days after the operation, according to the analysis methods used. The skins of Nile Tilapia and Bullfrog proved to be biocompatible up to 90 days after surgery.

Keywords: Biomaterials. Hernia defects. Nile Tilapia Skin. Bullfrog skin.

INTRODUÇÃO

O termo “hérnia” em perspectiva literal significa ruptura, sendo então a protusão anormal de órgão ou tecido através de defeito na parede abdominal adjacente, determinando fragilidade anatômica da parede muscular (SMEAK, 2018). Geralmente as hérnias abdominais são consequentes a traumas, queimaduras, desbridamento de infecções necrosantes, tratamento de síndrome compartimental, exérese de tumores, entre outras causas (RICCIARDI *et al.*, 2012).

As herniorrafias e hernioplastias abdominais são técnicas cirúrgica que compreendem a tentativa da reconstrução do defeito em parede abdominal, com objetivo de restaurar a musculatura e pressão intra-abdominal (FOSSUM, 2014; SMEAK, 2018). As correções herniárias são procedimento amplamente realizados na rotina cirúrgica. Everling e colaboradores (2020), em análise quantitativa em serem humanos de 2008 a 2018, contabilizaram mais de dois milhões de cirurgias de correção de hérnias realizadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), no Brasil.

Os procedimentos de hernioplastias preconizam a utilização de uma malha cirúrgica para síntese completa do defeito. Estas malhas podem apresentar origem sintética, biológica, reticular, laminar ou composta, também classificadas como absorvíveis, inabsorvíveis ou parcialmente absorvíveis (BILSEL; ABCI, 2012; MONTGOMERY, 2013; BELLÓN, 2014). Apesar da grande variedade de opções para materiais a serem utilizados em hernioplastias, cada tipo de malha compreende uma indicação clínica e forma de aplicação, a dificuldade dos cirurgiões é a determinação do tipo, momento e melhor local para a

implementar a malha em cada caso específico (RICCIARDI *et al.*, 2012).

A aplicação de malhas cirúrgicas tem sido exaustivamente testada a fim de conseguir uma prótese ideal, apresentando os mais brandos efeitos cicatríciais, biocompatibilidade, pouca ou nenhuma formação de aderências peritoneais, textura e flexibilidade compatíveis e alta resistência. Proporcionando proteção as vísceras e movimentação normal do abdome (BELLÓN, 2005; LIU *et al.*, 2011).

A pele de Tilápia do Nilo apresenta alto percentual de colágeno em sua composição, dos quais cerca de 57% é definido como colágeno tipo I, o qual possibilita a pele atender as propriedades físico-químicas necessárias para aplicação cirúrgica. Sua aplicação mimetiza a matriz extracelular do paciente, organiza as reformulações celulares através da liberação de sinais regulatórios específicos, os quais interagem diretamente com a resposta do organismo do paciente (HAYASHI *et al.*, 2014; ALVES *et al.*, 2015).

A pele de Rã-touro apresenta características biológicas únicas, alta diversidade bioquímica e propriedades de autodefesa, adquiridas através de sua adaptabilidade como espécie na cadeia de evolução. Destacam-se estudos das propriedades antiinflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas, ainda capacidade de permeabilidade seletiva, secreção de insulina e propriedades físicas que as tornam resistentes e maleáveis (FALCÃO *et al.*, 2002; WILLENS *et al.*, 2006; QIAN; JUNG; KIM, 2008; XU *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2020).

A utilização da pele de Rã-touro e da pele de Tilápia do Nilo conservada em glicerina 98% para correção de defeitos herniários pode vir a ser um método de baixo custo e eficaz, visto que une as propriedades vantajosas e comprovadas

das peles com as propriedades da glicerina 98% como conservante, a qual diminui a antigenicidade dos implantes, mantém o arcabouço colagenoso, reduzindo a possibilidade de contaminação.

O presente estudo teve como principal objetivo testar as peles de Rã-touro e Tilápia do Nilo como materiais inovadores, biocompatíveis e de baixo custo para confecção de próteses para correção de defeitos abdominais.

METODOLOGIA

AQUISIÇÃO E PREPARO DAS PRÓTESES

As peles de Tilápia do Nilo e Rã-touro foram obtidas através da FIPERJ, por doação, sendo as Tilápias provenientes de criatório no município de Cordeiro-RJ, e as de Rã de criatório legalizado do município de Guapimirim-RJ. Também, algumas peles de Tilápia, foram obtidas, por doação, de disciplinas relacionadas a aquicultura do curso de Medicina Veterinária do UNIFESO, sendo pescadas nos tanques do *Campus* Quinta do Paraíso (Teresópolis-RJ).

Ressalta-se que estas peles de Tilápia e Rã-touro foram coletadas após o abate dos animais, onde seriam resíduos do processamento destes, os processos foram realizados de maneira idêntica em ambas espécies, preconizando que a confecção dos implantes fosse equivalente independente do biomaterial.

O processamento das peles foi realizado de acordo com Jorge (2016) (Figura 1), após o descarte e retirada de fragmentos de carne, as peles foram imersas em bandejas de aço estéreis, contendo 1 litro de clorexidina 2%, onde permaneceram por 30 minutos, após, em uma segunda bandeja as peles foram lavadas de forma abundante com Solução Fisiológica Estéril (NaCl 0,9%). Em seguida acondicionadas de maneira estéril em caixas térmicas, onde foram transportadas em uma média de temperatura de 3°C, desde a saída dos estabelecimentos até a chegada ao laboratório de microbiologia do UNIFESO, localizado no *Campus* Quinta do Paraíso em Teresópolis-RJ. Para as peles coletadas no *Campus*, o processamento foi idêntico, apenas não foram conservadas para transporte, sendo processadas de maneira direta após o descarte.

No laboratório, ao redor do bico de Bunsen, preconizando área de segurança, cada pele foi cortada de maneira semelhante a um retângulo, e imersas em potes de armazenamento vedáveis e autoclavados, preenchidos com glicerina 98% com quantidade a garantir a cobrir todos os implantes. Os recipientes foram armazenados em temperatura ambiente, com ventilação e sem incidência de luz solar, onde permaneceram nestas condições por ao menos 30 dias, e até 1 ano. No momento de utilização, as peles foram reidratadas com Solução Fisiológica estéril (NaCl 0,9%), por mínimo de 20 minutos, e em seguida foi implantada.

Figura 1 - Confecção dos implantes de pele de Rã-touro. (A) disposição dos materiais na bancada; (B) Fragmentos da pele de Rã-touro já descarnada imersa em Clorexidina degermante; (C) Recipiente de vidro hermético, contendo implante de pele de Rã-touro imerso em glicerina 98%



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

ANIMAIS E LOCAL DE EXPERIMENTAÇÃO

Este projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa para o Uso de Animais de Experimentais do Centro Universitário Serra dos Órgãos, sendo aceito a implementação da pele de Rã-touro e da pele de Tilápia do Nilo em ratos Wistar, apresentando registros respectivos nº495/19 e nº 496/19. Com renovação em 2021 após completar 2 anos de vigência do CEUA.

Este estudo foi conduzido no Biotério do *Campus* Quinta do Paraíso, pertencente ao Centro Universitário Serra

dos Órgãos - UNIFESO. Na realização deste trabalho foram utilizados 24 ratos, variedade Wistar, machos, provenientes do biotério onde ocorreu o experimento. Estes animais foram divididos aleatoriamente em 8 grupos de 3 animais, como demonstrado na Tabela 1.

Os animais foram separados em grupos determinados de acordo com a espécie de origem do implante (grupos onde utilizou-se pele de Tilápia do Nilo e grupos onde utilizou-se pele de Rã-touro), e subdivididos conforme o período de eutanásia, em sétimo, décimo quinto, trigésimo ou nonagésimo dia de pós-operatório.

Tabela 1 – Divisão dos grupos experimentais em períodos de eutanásia e avaliação pós-operatória.

GRUPOS	EUTANÁSIA	EUTANÁSIA	EUTANÁSIA	EUTANÁSIA
	7° DIA	AO 15° DIA	30° DIA	90° DIA
Grupos onde utilizou-se pele de Tilápia do Nilo conservada em Glicerina 98%	Grupo T7d n=3	Grupo T15d n=3	Grupo T30d n=3	Grupo T90d n=3
	Grupo R7d n=3	Grupo R15d n=3	Grupo R30d n=3	Grupo R90d n=3
Grupos onde utilizou-se pele de Rã-touro conservada em Glicerina 98%				

Este estudo também avaliou clinicamente e por termografia infravermelha os animais e os implantes durante os períodos pós-operatórios determinados, e macroscopicamente após a eutanásia.

PROTOCOLO ANESTÉSICO

A técnica anestésica para procedimento de hernioplastia consistiu na contenção química dos ratos através de circuito aberto com

vaporizador calibrado e Oxigênio 100%, com CAM variando de 2 a 5, após os animais completamente inconscientes foi realizada a administração por via intraperitoneal com os fármacos Cetamina (Cetamin ® 10%) (dose:75mg/Kg) associada a Xilazina (Xilazin ® 2%) (dose: 10mg/Kg), a manutenção do plano anestésico ocorreu com Isoflurano (CAM 2 a 3) por via inalatória em sistema semiaberto,

através de máscara facial própria para espécie e Estação Anestésica para Ratos e Camundongos

da Biofarma® (Figura 2) (FLECKNELL, RICHARDSON E POPOVIC, 2007).

Figura 2- Estação de anestesia.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

PROTOCOLO CIRÚRGICO

A técnica cirúrgica seguiu modelo de Jorge (2016), compreendendo incisão xifopubiana de pele e na linha média seguindo com a dissecação de tecido subcutâneo e criação de falha em toda a espessura da parede abdominal direita, incluindo aponeuroses e fâscias musculares, músculos e peritônio, medindo 1,5

centímetros no eixo transversal e 3,0 centímetros no eixo longitudinal. Implantou-se a prótese respectiva, de acordo com o grupo em questão (pele de Tilápia do Nilo ou pele de Rã-touro) com sutura contínua simples com fio de nylon 4.0, interrompidas em cada bordo da ferida, em seguida a pele foi sutura com mesmo fio, em pontos padrão *Wolf* (“u” horizontal interrompido) (Figura 3).

Figura 3 – Fotomicrografia de implante de pele de Rã-touro (A) e pele de Tilápia do Nilo (B) fixados em parede abdominal de ratos



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

PÓS-OPERATÓRIO

Cerca de 40 segundos após a interrupção do anestésico os ratos apresentaram os primeiros reflexos de recuperação, sendo realocados em suas caixas de biotério recobertas por maravalha para aquecimento, em ambiente com temperatura controlada. Também, em pós-operatório imediato foi administrado o analgésico opioide Cloridrato de Tramadol (12,5mg/Kg) via subcutânea, o qual também foi administrado nos dois dias seguintes, de 12 horas em 12 horas, por mesma via (FLECKNELL; RICHARDSON; POPOVIC, 2007). Nos primeiros 8 dias de pós-operatório foi realizada a administração do antimicrobiano através da água de beber, com Enrofloxacina (Chemitril ®10%) (dose: 100mg/1 Litro de água ingerido) (VIANA, 2007). Conforme Burger (2014) não foi administrado nenhum fármaco com princípio anti-inflamatório com intuito de evitar qualquer alteração nos resultados do experimento.

Nos dias seguintes ao experimento foi realizada a mensuração da dor através do manual de códigos e expressões faciais de dor em ratos de laboratório, através da escala Grimace para ratos (SOTOCINAL et al., 2011). A partir daí, realizou-se o resgate analgésico dos animais por mais dois dias, de 24 em 24 horas, também com o opioídeo Cloridrato de Tramadol (Hipolabor Farmacêutica)

(dose:12,5mg/Kg), por via subcutânea (FLECKNELL; THOMAS, 2017). –

Os animais permaneceram durante o período pós-operatório em grupos de dois ou três ratos, em caixas de polipropileno autoclaváveis. As caixas apresentam dimensões de 40 centímetros de comprimento por 32 centímetros de largura e 16 centímetros de altura, e são enriquecidas com rolos de papelão para entretenimento dos animais.

AValiação CLÍNICA

A avaliação clínica foi realizada diariamente, com método semelhante ao de Jorge (2016), avaliando a presença de edemas, seromas, infecções, hematomas, abscessos, fistulas e necrose local da ferida cirúrgica. Para determinação desses parâmetros estipulou-se escores de gravidade sendo, leve (+), moderado (++) , grave (+++) e muito grave (++++).

A fim de obter informações e controle sobre os parâmetros corpóreos dos animais, para posterior análise ponderal, realizou-se a pesagem dos roedores nos dias 0, 3, 7, 15, 30 e 90 de pós-operatório.

ANÁLISE MACROSCÓPICA

Esta etapa de avaliação ocorreu após a eutanásia dos animais, procedimento realizado nos roedores de acordo com o dia pré-determinado, o procedimento ocorreu após a sedação profunda dos animais via inalatória, através da caixa de acrílico, com Isoflurano

(CAM 5) e oxigênio 100%, em seguida, com os animais completamente inconscientes foi realizada a administração da sobredosagem da associação de Cetamina e Xilazina, por via intraperitoneal (IP). Procedimento de acordo com o preconizado na Resolução Normativa nº 37 do CONCEA, item 9.1.2.3 de 27 de julho de 2017, promulgada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, cuja atribuição lhe foi conferida pelo art. 5 da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro e 2008.

Seguinte a eutanásia dos animais a necropsia foi realizada com uma grande incisão em formato de “U” ao longo de toda região abdominal, nas camadas da pele, tecido subcutâneo e musculatura abdominal. Com a realização do reparo em ambas extremidades do defeito, alcançando a visão do conteúdo abdominal, da prótese e do tecido

adjacente, sendo realizada então, a avaliação macroscópica quanto a presença de aderências entre o implante, fio de sutura e as estruturas abdominais, ainda taxa de adesão e os órgãos envolvidos.

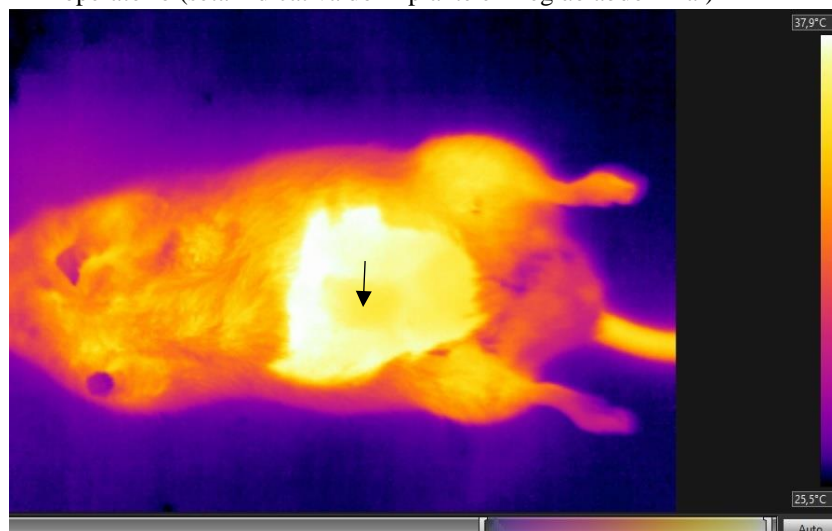
A classificação das aderências foi realizada em uma adaptação de Diogo-Filho e colaboradores (2004) e Jorge (2016), sendo então: Grau 0 ou ausente – sem aderências;

Grau 1 ou leve (+) – número reduzido de aderências (≤ 3), de caráter fibrinoso, facilmente desfeitas pela manipulação; Grau 2 ou moderado (++) – aderências firmes (>3) e/ou resistentes a manipulação, entre alças intestinais, sem envolver parede abdominal; Grau 3 ou grave (+++) – aderências firmes, resistentes a manipulação, entre parede abdominal e órgão ou estrutura; Grau 4 ou muito grave (+++++) – aderências firmes, resistentes a manipulação, entre alças intestinais e parede abdominal, com fistula entérica.

TERMOGRAFIA INFRAVERMELHA

A termografia infravermelha faz a mensuração da variação de temperatura cutâneas nas regiões correspondentes aos implantes e regiões controle, através de um termógrafo da marca Flir®, modelo T420, Danderyd Suécia, resolução 320x240, com sensibilidade terminal de 0.045°C e emissividade 0,99 a temperatura e umidade ambiental. As imagens eram capturadas com o termógrafo há 1 metro do rato, em sala climatizada de 19°C a 22°C, após a tricotomia completa do abdômen do rato, nos períodos pós-operatórios 0, 3, 7, 15, 30, 50 e 90 de pós-operatório.

Figura 4 - Imagem termográfica de roedor com implante de pele de Rã-touro, em 30 dias de pós-operatório (seta indicativa do implante em região abdominal)



Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

O processamento matemático das imagens termográficas obtidas foi realizado através do aplicativo FLIR Tools®. O método consistiu em avaliar a temperatura média cutânea de duas regiões do abdômen do animal, a porção esquerda é utilizada para controle térmico, já que não havia presença de prótese, e a porção direita é onde localizou-se o implante da pele em questão. O intuito destas avaliações foi observar as variações térmicas causadas pelo implante, que foram interpretadas sendo indicativas de reação inflamatória e presença de vascularização, nos períodos de 0, 3, 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório.

A temperatura cutânea média das regiões citadas acima foram mensuradas através da criação de duas elipses, uma em cada lado abdominal, de aproximadamente 0,001m², criada pelo próprio aplicativo FLIR Tools®. A primeira elipse representou a região do implante do biomaterial sendo denominada E11 (lado direito), e a segunda elipse se denomina E12 e representa a região controle (lado esquerdo), estabelecida como região controle. Com a obtenção da média aritmética dos valores de E11 e E12 de cada integrante em seu determinado grupo alcança-se o valor médio para cada grupo em cada determinado período avaliado, denominado de Mel1x e Mel2x. Estes dois valores são utilizados para se alcançar o percentual da variação média de temperatura do grupo em questão em um determinado período pós-operatório, com a equação: **Variação Média de Temperatura no momento X = (Mel1x / Mel2x) – 1**. Também, foi realizada o cálculo da diferença média das temperaturas dos lados abdominais, através da fórmula: **Diferença média de temperatura no momento X = Mel1x – Mel2x**.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

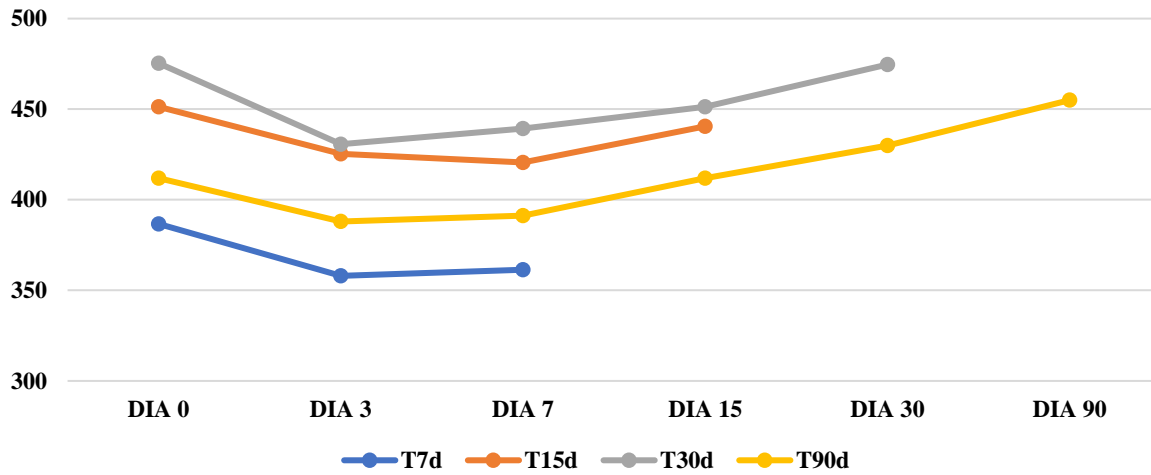
O teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney ($p < 0,05$) foi aplicado na avaliação e cálculos da análise ponderal do peso dos roedores e na mensuração termográfica das próteses e região controle, ainda, entre os dois tipos de biomateriais ao longo do período pós-operatório determinado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizada a aplicação de implantes de Tilápia do Nilo conservada em glicerina 98%, em doze animais, divididos em quatro grupos com data de eutanásia em 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório. Assim como foi implantada a pele de Rã-touro conservada em glicerina em doze animais, subdivididos em quatro grupos, com data de eutanásia em 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório. Todos os animais foram avaliados nos dias 0, 3, 7, 15, 30 e 90 de forma clínica e termográfica. E, após eutanásia, avaliou-se macroscopicamente a prótese e as aderências formadas entre as estruturas abdominais e os implantes biológicos.

A análise ponderal se encaixa como a primeira análise clínica a ser descrita. Os animais que receberam o implante de pele de Tilápia do Nilo demonstraram, em média, a maior perda de peso ao terceiro dia de pós-operatório, a partir o peso foi sendo recuperado, aos trinta dias de pós-operatório o peso já praticamente se equivalia com o do dia do procedimento (0,14%), e ao nonagésimo dia os animais apresentavam-se cerca de 9,52% mais pesados do que no dia zero (Figura 1).

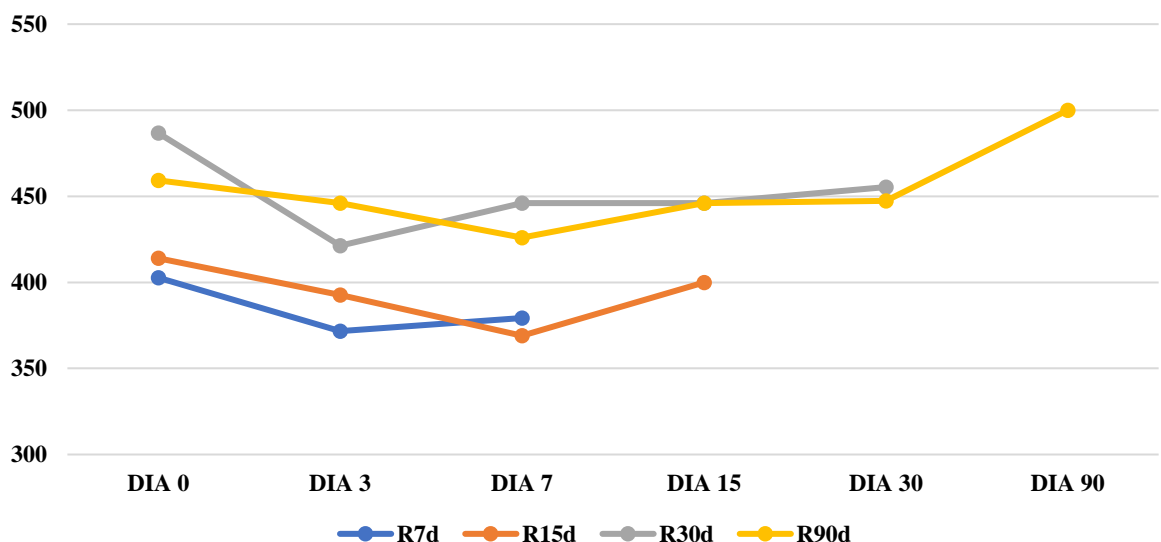
Figura 5 - Gráfico com pesos médios dos animais com implante de pele de Tilápia do Nilo, por grupo, nos diferentes períodos pós-operatórios



Os animais que receberam o implante de Rã-touro apresentaram o ápice da perda de peso diferente entre os grupos, os grupos eutanasiados ao sétimo e trigésimo dia apresentaram a maior perda de peso ao terceiro dia de pós-operatório, e os grupos eutanasiados ao décimo quinto e nonagésimo dia

apresentaram a perda ápice de peso ao sétimo dia pós-cirúrgico. A partir desta perda ápice os animais seguiram recuperando peso, estando ao nonagésimo dia de pós-operatório cerca de 8,9% mais pesados do que no dia do procedimento cirúrgico.

Figura 6 - Gráfico com pesos médios dos animais com implante de pele de Rã-touro, por grupo, nos diferentes períodos pós-operatórios



Em ambos os grupos a perda de peso ocorreu somente até o sétimo dia de pós-

operatório iniciando a partir daí um ganho ponderal até os 90 dias de pós-operatório. Essa

perda de peso foi atribuída a distúrbios metabólicos associados ao procedimento anestésico e trauma cirúrgico assim como descreve Sartori e Mello (2018).

A pele de Tilápia do Nilo apresentou características de maleabilidade e resistência após a conservação em glicerina 98%, após o período mínimo de 30 dias sob conservação, permanecendo por mais tempo. Seu papel como implante demonstrou movimentação normal do animal, conforme os métodos de análise, também ausência de recidivas e eviscerações. Conforme demonstra a Tabela 2, as alterações clínicas observadas em pós-operatório os

edemas aparecerem em 33% dos animais, onde em maioria os quadros eram leves (+) e em apenas um dos quadros era moderado (++). O seroma subcutâneo apareceu em 25% dos animais, sendo os três animais ao décimo quinto dia de pós-operatório, onde foram drenados e os fluidos apresentavam aspecto característico, sem indícios visuais e olfativos de infecção, o primeiro quadro apareceu como moderado (++), um segundo em grau grave (1 ml) (+++) e um terceiro em grau muito grave (2,5 ml) (++++). O abscesso foi identificado em 8,33% dos ratos submetidos a cirurgia, demonstrado em um animal, em grau grave (+++).

Tabela 2- Resultado da análise clínica, com classificação realizada conforme Jorge (2016), em cada rato, de acordo com os dias pós-operatórios, com implantes de Pele de Tilápia do Nilo.

ANIMAIS	D 1	D3	D4	D6	D 7	D15	D22	D30	D9
S					7				0
R1-T _{7d}	-	-	-	-	-				
R2-T _{7d}	-		-	-	-				
R3-T _{7d}	-	-	-	-	-				
R1-T _{15d}	-	-	-	-	-	Seroma a (++)	-		
R2-T _{15d}	-		-	-	-	Seroma a (+++)	-		
R3-T _{15d}	-	-	-	-	-	Seroma a (++++)	-		
R1-T _{30d}	-	Edema a (++)	Edema a (++)	Edema a (+)	-	-	Abscesso o (+++)	Abscesso o (+++)	
R2-T _{30d}	-	-	-	-	-	-	-	-	

R3-T _{30d}	Seroma (+)	-	-	Edema (+)	-	-	-	-
R1-T _{90d}	-	-	-	-	-	-	-	-
R2-T _{90d}	-	-	-	-	-	-	-	-
R3-T _{90d}	-	-	-	-	-	-	-	-

Os animais que receberam a pele de Rã-touro não apresentaram infecção, hematoma, abscesso, fistula ou necrose, conforme mostra a Tabela 3. Percentualmente 66,67% dos animais não apresentaram alterações clínicas. O edema foi observado em 33,3% dos animais, correspondente a 3 dos 4, em até 7 dias de pós-operatório, o que pode ser relacionado com o período ápice do trauma cirúrgico. O seroma foi observado em dois animais que receberam este implante, 16,6% dos animais, todos em quadro leve, envolvendo rápido e sozinhos, sem

complicações. Ao nonagésimo dia de pós-operatório o Rato 2, do grupo R90d, apresentou hérnia em região caudal do abdômen, este roedor foi submetido a necropsia onde constatou-se ruptura em porção ventral do implante e protusão de ligamento testicular esquerdo.

Tabela 3- Resultado da análise clínica, com classificação realizada conforme Jorge (2016), em cada rato, de acordo com os dias pós-operatórios, com implantes de Pele de Rã-touro.

ANIMAIS	D 1	D2	D3	D7	D12	D15	D30	D90
R1-R _{7d}	-	-	-	-				
R2-R _{7d}	-	-	-	-				
R3-R _{7d}	-	-	-	-				
R1-R _{15d}	-	-	-	-	-	-		
R2-R _{15d}	-	Edema (++)	-	-	-	-		
R3-R _{15d}	-	-	-	-	-	-		
R1-R _{30d}	-	-	-	-	-	-	-	
R2-R _{30d}	-	-	-	-	-	-	-	
R3-R _{30d}	Seroma (+)	-	-	Edema (+)	-	-	-	
R1-R _{90d}	Edema (+)	-	-	-	-	-	-	-
R2-R _{90d}	-	-	-	Edema (+)	Seroma (+)	-	-	Recidiva herniária.
R3-R _{90d}	-	-	-	-	-	-	-	-

O edema aparece em mais estudos com implantes biológicos em roedores, Burguer (2014) e Jorge (2016) apresentam o mesmo, com baixa incidência, como alteração clínica pós-operatória de curto prazo. O seroma é presente em estudos com malhas biológicas em humanos, como destaca Bellows e colaboradores (2013), em uma revisão literária onde está complicação incide em 15,2% dos estudos de procedimentos para correções de hernias incisionais em humanos. Ainda, Aiolfi (2019) também destaca o seroma como complicação pós-operatórias comum em procedimentos de hernioplastias, independente da técnica de realização, em procedimentos abertos, laparoscópicos ou robóticos. A presença de seroma ainda é atribuído a presença de espaço morto subcutâneo pós cirúrgica, fato consequente principalmente ao tamanho anatômico dos ratos, onde não é possível realizar sutura de subcutâneo.

A análise macroscópica demonstrou presença de aderências em todos os animais, independente do grupo ou material componente do implante, como expõe a Tabela 4. O implante de Tilápia do Nilo demonstrou as aderências em maioria restritas ao omento, ligamento testicular ou ambos. A presença de aderência do omento ocorreu em 52,1% dos roedores, e em ligamento testicular em 43,7% dos roedores, ressaltando que alguns animais apresentaram ambas as aderências. Em maioria as aderências se apresentaram manipuláveis e facilmente desfeitas (Grau 1), em apenas um animal com aderência em omento por toda prótese esta e apresentava com grau moderado de dificuldade para desfazê-la. Um animal que recebeu o implante apresentou aderência localizada no intestino delgado (4,3%), especificadamente no jejuno, apresentava difícil manipulação, entretanto não havia fístulas intestinais presentes.

Tabela 4- Análise macroscópica dos animais que receberam os implantes de pele de Tilapia do Nilo, quanto a presença, local e grau das aderências

Ratos	Nº total de aderências	Órgão aderido	Local da aderência	Dificuldade de desfazer	Grau
Rato 1 T _{7d}	2	Ligamento testicular direito	Sutura	Fácil	1
		Omento	Sutura	Fácil	1
Rato 2 T _{7d}	1	Omento	Prótese	Fácil	1
Rato 3 T _{7d}	2	Ligamento testicular direito	Prótese	Fácil	1
		Omento	Prótese	Fácil	1
Rato 1 T _{15d}	2	Omento	Prótese	Fácil	1
		Omento	Prótese	Fácil	1
Rato 2 T _{15d}	2	Ligamento testicular direito	Sutura	Fácil	1
		Omento	Sutura	Fácil	1

Rato 3 T _{15d}	2	Ligamento testicular direito	Sutura	Fácil	1
		Omento	Sutura	Fácil	1
Rato 1 T _{30d}	2	Ligamento testicular direito	Sutura	Fácil	1
		Omento	Prótese	Fácil	1
Rato 2 T _{30d}	4	Ligamento testicular direito e esquerdo	Sutura e Prótese	Fácil	1
		Omento	Sutura	Fácil	1
		Intestino Delgado (Jejuno)	Prótese	Difícil (Sem fistula)	3
Rato 3 T _{30d}	2	Ligamento testicular direito	Sutura	Fácil	1
		Omento	Sutura	Fácil	1
Rato 1 T _{90d}	1	Omento	Prótese	Médio	2
Rato 2 T _{90d}	2	Ligamento testicular Direito	Prótese e Sutura	Fácil	1
		Omento	Sutura	Fácil	1
Rato 3 T _{90d}	1	Ligamento testicular direito	Sutura e Prótese	Fácil	1

Omento: 52,17%

Nº total de aderências	23	Ligamento Testicular: 43,47	Sutura: 60,8%	Fácil: 91,3%	Grau 1: 91,3%
		Intestino: 4,3%	Prótese: 47,87%	Médio: 4,3%	Grau 2: 4,3%
				Difícil: 4,3%	Grau 3: 4,3%

Os animais que receberam a pele de Rã-touro demonstraram formação de aderências em ligamento testicular, omento ou ambos, conforme demonstra a Tabela 5. A presença de aderência do omento ocorreu em 47,8% dos roedores, e em ligamento testicular em 52,17% dos roedores, ressaltando que em maioria os animais apresentaram ambas as aderências. Em maioria as aderências se apresentaram

manipuláveis e facilmente desfeitas (Grau 1). Ao nonagésimo dia de pós-operatório foi observada a recidiva herniária em um animal do grupo R90d, ao decorrer do procedimento de necropsia constatou-se que a hernia média 2,3 cm x 1,3 cm, a mesma foi ocasionada pela ruptura em porção caudal da prótese de pele de Rã-touro, constatando fixação das bordas da prótese a parede muscular.

Tabela 5- Análise macroscópica dos animais que receberam os implantes de pele de Rã-touro, quanto a presença, local e grau das aderências

Ratos	Nº total de aderências	Órgão aderido	Local da aderência	Dificuldade de desfazer	Grau
Rato 1 Rã _{7d}	1	Ligamento testicular direito	sutura/prótese	Fácil	1
Rato 2 Rã _{7d}	2	Ligamento testicular direito	prótese	Fácil	1
		Omento	prótese	Fácil	1
Rato 3 Rã _{7d}	2	Ligamento testicular direito	sutura	Fácil	1
		Omento	sutura/prótese	Fácil	1
Rato 1 R _{15d}	2	Omento	sutura/prótese	Fácil	1
		Omento	sutura/prótese	Fácil	1
Rato 2 R _{15d}	2	Ligamento testicular direito	prótese	Fácil	1
		Omento	prótese	Fácil	1
Rato 3 R _{15d}	2	Ligamento testicular direito	sutura	Fácil	1
		Omento	sutura/prótese	Fácil	1
Rato 1 R _{30d}	2	Ligamento testicular direito	sutura	Fácil	1
		Omento	prótese	Fácil	1

Rato 2 R _{30d}	2	Ligamento testicular esquerdo	sutura e prótese	Fácil	1
		Omento	sutura	Fácil	1
Rato 3 R _{30d}	2	Ligamento testicular esquerdo	sutura	Fácil	1
		Omento	sutura	Fácil	1
Rato 1 R _{90d}	2	Ligamento testicular direito	sutura	Fácil	1
		Omento	sutura	Fácil	1
Rato 2 R _{90d}	2	Ligamento testicular esquerdo	sutura	Fácil	1
		Ligamento testicular direito	sutura e prótese	Fácil	1
Rato 3 R _{90d}	2	Ligamento testicular direito	sutura e prótese	Fácil	1
		Omento	sutura	Fácil	1
		Omento: 47,8%	Sutura:43,5%		
Nº total de aderências	23	Ligamento Testicular: 52,17%	Prótese:21,7%	Fácil: 100%	Grau 1: 100%
			Sutura e Prótese: 34,8%		

A presença de aderências em omento é muito ocorrente em casos de estudos com malhas biológicas (Vidor *et al.*, 2013; Leal *et al.*, 2014; Jorge, 2016), também em estudos com a utilização destas malhas em procedimentos de hernioplastias (Leal *et al.*, 2014). Entretanto, as aderências em omento demonstram não causar prejuízos ao paciente, Burguer (2014) descreve o omento com importância no carreamento de anticorpos,

promovendo a absorção e destruição de células estranhas, combatendo e infecções.

As aderências em ligamento testicular podem ser atribuídas ao mecanismo termo regulatório dos roedores, onde conforme descreve Jorge (2016) os testículos são translocados para cavidade abdominal, entrando em contato com a porção caudal e fio de sutura de fixação dos implantes.

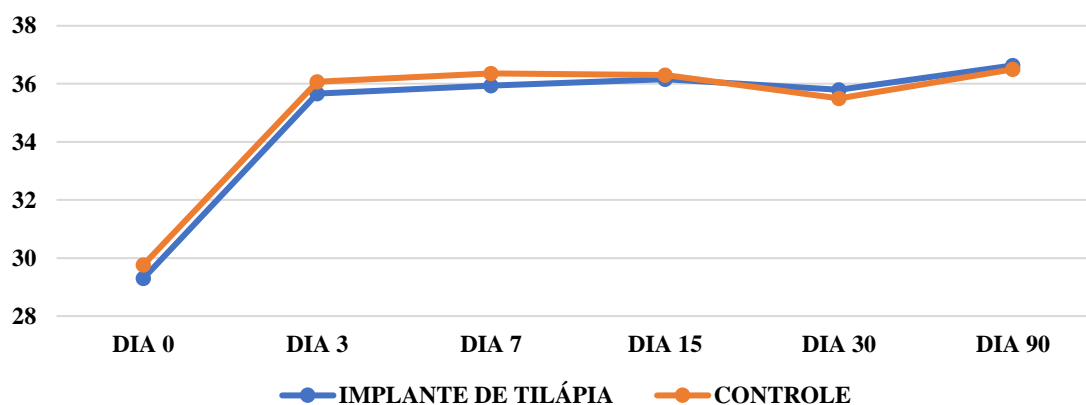
A hérnia que foi observada com implante de Rã-touro aos 90 dias de pós-operatório pode ser atribuída ao processo de cicatrização do organismo do roedor frente ao implante. Lake e Deeken (2017) descrevem a recorrência herniária geralmente na interface implante-tecido, o que difere deste experimento onde a hérnia foi presente por ruptura do implante, já que a sutura permanecia intacta. Os autores ainda citam a sobreposição do defeito, falha em síntese miofascial, contratura da ferida, pouco crescimento de tecido ou resposta inflamatória como os fatores contribuintes a reincidência herniária

A análise termográfica detectou a variação de temperatura corpórea da área lesionada ou alterada por conta da assimetria em relação ao lado controle, avaliou-se o quadrante direito do abdome onde estava implementada os implantes de pele, e o quadrante esquerdo como lado controle, onde somente foi realizado tricotomia em região abdominal completa. Vale ressaltar que os valores das temperaturas médias de ambos os lados e diferença delas não foi relevante estatisticamente conforme o teste estatístico não paramétrico de Mann-Witman ($p > 0.5$)

Os animais com pele de Tilápia do Nilo apresentavam no dia do procedimento cirúrgico

(D0) a temperatura abdominal baixa, variando de 28,5°C a 33,5°C, a mais evidente causa deste fenômeno é o procedimento anestésico. Ao dia 3 de pós-operatório a região abdominal do implante (direita) apresentava-se mais fria que a região controle (esquerda). Ao sétimo dia pós-operatório a média da temperatura cutânea abdominal direita (com implante) estava mais próxima da temperatura do lado esquerdo (controle), do que ao terceiro dia, entretanto ainda se apresentava cerca de 0,4°C mais quente do que a região com o implante. As avaliações do décimo quinto e trigésimo dia pós-operatório demonstram um possível processo de angiogênese celular, por conta da proximidade das temperaturas nesta data, e posterior aumento da temperatura da região com o implante de pele de Tilápia. Ao trigésimo dia as temperaturas do lado controle se apresentaram de 0,47% a 1,1% menores do que o lado com o implante. As temperaturas serem maiores do lado abdominal do implante quando comparado ao lado controle podem demonstrar provável presença de neovascularização no implante. Aos 90 dias de pós-operatório é possível observar a proximidade das temperaturas dos lados abominais, como demonstra a Figura 3.

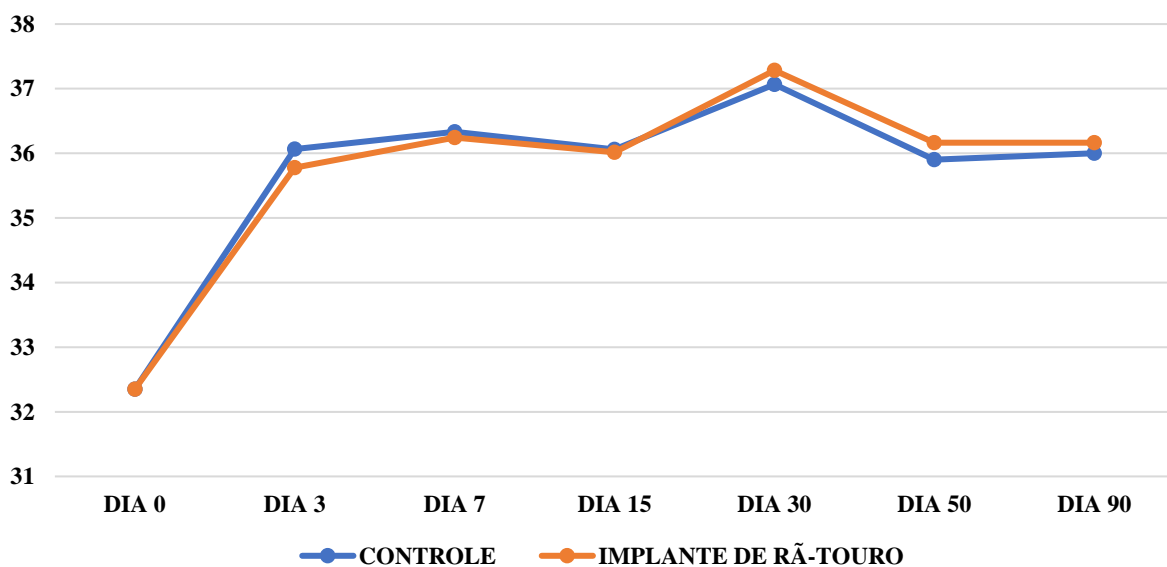
Figura 7- Gráfico das médias de temperaturas (°C) dos lados abdominais com o implante de Tilápia do Nilo (direito) e lado controle (esquerdo), ao longo dos períodos pós-operatórios



No grupo de animais que receberam implante de pele de Rã-touro, conforme é possível observar na Figura 4, no dia 0, após o procedimento cirúrgico, a temperatura cutânea abdominal dos roedores apresentou-se, em média, 32,3°C no lado controle (esquerdo) e 32,3°C no lado com a prótese (direito). Ao terceiro dia de pós-operatório os ratos apresentavam a temperatura média de 36,07°C no lado esquerdo controle, e 35,7°C no lado direito, com o implante de Rã-touro. As análises das imagens termográficas ao sétimo dia de pós-operatório, demonstraram temperatura média de 36,3°C no lado esquerdo controle abdominal, e de 36,2°C no lado direito com o implante de pele de Rã, tendo o lado controle com a temperatura 0,25% mais quente do que o lado

com o implante de pele de Rã. Aos trinta dias pós-operatório as temperaturas de todos os animais apresentavam pouca variação, sendo em média 37°C no lado controle (esquerdo) e 37,2 °C no lado com o implante de pele de Rã, demonstrando este lado 0,58% mais quente do que o controle. Aos noventa dias de pós-operatório, os animais apresentavam pouca variação da temperatura entre as porções abdominais, a região controle demonstrou em média 36°C e a região com o implante 36,1°C, apresentando-se 0,4% mais quente.

Figura 8 - Gráfico das médias de temperaturas (°C) dos lados abdominais com o implante de Rã-touro (direito) e lado controle (esquerdo), ao longo dos períodos pós-operatórios



As baixas médias de temperatura ao dia do procedimento cirúrgico podem ser correlacionados com o efeito hipotensor dos fármacos anestésicos, já que segundo Lin e Riddell (2003) a Xilazina possui efeito hipotensor e hipotérmico devido a sua seletividade por receptores adrenérgicos α_2 . Ainda, Rincón, Sessler e Valero (2004), Clark-Price (2015) e Sartori e Mello (2018), onde hipotermia aparece de forma característica ao procedimento anestésico em roedores, variando de acordo com o emprego da técnica e associação dos fármacos.

Contudo, todos os animais apresentaram logo após o procedimento cirúrgico e até aproximadamente o decimo quinto dia a temperatura menor no lado onde localizava-se o implante (direito), estima-se que devido a formação da neovascularização, concretizada com o passar do tempo, conforme descreve Jorge (2016), onde constatou-se maior índice inflamatório no sétimo dia pós-operatório por termografia infravermelha e por análise histológica, tantos nos implantes de Rã-touro quanto nos implantes sintéticos, demonstrando a temperatura do lado controle

elevada. Ainda, as aderências são encontradas a partir do sétimo dia de pós-operatório, como também descreve Jorge (2016), o que pode ser relacionado com o omento promovendo e fornecendo vascularização ao implante.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conservação de implante biológicos de pele de rã-touro e pele de Tilápia do Nilo em glicerina 98% em até 1 ano demonstrou ser uma alternativa econômica e acessível, já que os implantes permaneceram com características físicas de maleabilidade, resistência e elasticidade ideais e iguais desde antes a implantação até o momento do uso.

A pele de Rã-touro e Tilápia do Nilo, conservadas em glicerina, se apresentaram biomateriais promissores, não causando reações locais ou sistêmicas adversas aos ratos em que foram implantadas, de acordo com os métodos de análise empregados neste estudo.

As análises clínicas e termográficas demonstraram que os implantes de Rã-touro e Tilápia do Nilo glicerinados se enquadram de forma positiva quando implantados em região abdominal, não infringindo na mobilidade do animal e causando brandas respostas do organismo.

Sob aspectos clínicos, termográficos e macroscópicos, a pele de Rã-touro e de Tilápia do Nilo, conservada em glicerina, podem ser consideradas um implante biocompatível e eficaz para correção de hérnias abdominais, em ratos Wistar, em até 90 dias de pós-operatório.

Apesar de ainda ser necessário aprofundamento através de novos estudos, a pele de Rã-touro e de Tilápia do Nilo glicerinadas se mostram, a princípio, um biomaterial extremamente promissor, tendo potencial para ser inserido na realidade da medicina veterinária para reparação de defeitos musculares, por seu baixo custo, acessibilidade e baixa reação corporal.

Novos estudos são necessários para fornecer subsídios para obtenção de mais

profundas informações da aplicação dos implantes de pele de Rã-touro conservados em glicerina 98%, e possibilitar a sua utilização cirúrgica em animais domésticos e em seres humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIOLFI, A., CAVALLI, M., MICHELETTO, G. LOMBARDO, F. BONITTA, G.; MORLACCHI, A.; BRUNI, P.G.; CAMPANELLI, G.; BONA, D. Primary inguinal hernia: systematic review and Bayesian network meta-analysis comparing open, laparoscopic transabdominal preperitoneal, totally extraperitoneal, and robotic preperitoneal repair. *Hernia*. v. 23, p.473–484, abr/mai, 2019.
- ALVES, A. P. N. N.; VERDE, M. E. Q. L.; FERRÉIRA-JUNIOR, A. E. C.; SILVA, P. G. B.; FEITOSA, V. P.; LIMA-JÚNIOR, E. M.; MIRANDA, M. J. B.; MORAES-FILHO, M. O. Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. *Revista Brasileira de Queimaduras*, v.14, n.3, p. 203-210, 2015.
- BELLÓN, J. M. Propuesta de una nueva clasificación de prótesis destinadas a la reparación de defectos herniarios em lapared abdominal. *Cir Esp.*, v.78, n.3, p.148-51, 2005.
- BELLÓN, J.M. Revisión de una clasificación de materiales protésicos destinados a la reparación herniaria: correlación entre estructura y comportamiento em los tejidos receptores. *Revista Hispanoamericana de Hernia*, v.2, n.2, p.49-57, 2014.
- BELLOWS, C. F.; SMITH, A.; MALSBURY, J.; HELTON, W. S. Repair of incisional hernias with biological prosthesis: a systematic review of current evidence. *The American Journal of Surgery*, v. 205, p. 85-101, 2013.
- BILSEL, Y.; ABCI, I. The search for ideal hernia repair; mesh materials and types.

- International Journal of Surgery. v.10, n.6, p.317-21, 2012.
- BURGER, C. P. Telas de polipropileno e de submucosa de intestino de suíno na reparação de falhas na parede abdominal de ratos (*Rattus norvegicus* Albinus). Jaboticabal, 2014. 84f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014.
- CLARK-PRICE, S. Inadvertent Perianesthetic Hypothermia in Small Animal Patients. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*. v.45, n.5, p. 983-94, 2015.
- DEEKEN, C.R.; LAKE, S.P. Mechanical properties of the abdominal wall and biomaterials utilized for hernia repair. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. v.74. p.411-427, 2017.
- FALCÃO, S.C.; LOPES, S.L.; COELHO, A.R. de B.; ALMEIDA, E.L. Pele de Rana *Catesbeiana* como curativo biológico oclusivo no tratamento de feridas cutâneas produzidas em cães. Alterações macroscópicas e microscópicas resultantes da interação desses tecidos. Estudo preliminar. *Acta Cir. Bras*, v. 17, n.3, 2002.
- FLECKNELL, P. A.; RICHARDSON, C. A.; POPOVIC, A. Anesthesia, analgesia, and immobilization of selected species and classes of animals. *Laboratory Animals*. In: LUMB & JONES. *Veterinary Anesthesia and Analgesia*. 4.ed. USA (Iowa): Blackwell Publishing, 2007.
- FOSSUM, T. W. Surgery of the Abdominal Cavity. In: FOSSUM, T. W. *Small Animal Surgery*. 4.ed. United States of America: Editora Elsevier, 2014. p.364-368
- HAYASHI, Y.; IKEDA, T.; YAMADA, S.; KOYAMA, Z.; YANAGIGUCHI, K. The application of fish collagen to dental and hard tissue regenerative medicine. In: KIM, S-K. *Seafood Processing By-Products*. 1.ed. USA (New York): Springer, 2014. 597p.
- JORGE, S. F. Avaliação Clínica, Termográfica e Morfológica da Utilização da Pele de Rã-Touro (*Lithobates catesbeianus*) e do Polietileno de Baixa Densidade Laminar Bolhoso (Plástico Bolha) na Hernioplastia da Parede Abdominal de *Rattus norvegicus*, variedade Wistar. 2016. 92f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.
- LEAL, L.M.; FERREIRA, A.R.S.; REIS, A.C.G.; MARTINS, L.L.; GARCIA FILHO, S.P.; MACHADO, R.F..O uso do peritônio de paca conservado em solução supersaturada de açúcar a 300% ou glicerina a 98% implantados na parede abdominal de ratos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.66, n.5, p.1383-1391, 2014.
- LIN, H. C.; RIDDELL, M. G. Preliminary study of the effects of xylazine or detomidine with or without butorphanol for standing sedation in dairy cattle. *Vet. Ther.*, v.4, p.285-91, 2003.
- LIU, Z., TANG, R., ZHOU, Z., SONG, Z., WANG, H., GU, Y.. Comparison of Two Porcine-Derived Materials for Repairing Abdominal Wall Defects in Rats. *PLoS ONE*. v.6, n.5., 2011.
- MONTGOMERY, A. The battle between biological and synthetic meshes in ventral hernia repair. *Hernia*, v.17, p.3-11, 2013.
- QIAN, Z.J.; JUNG, W.K.; KIM, S.K..Free Radical Scavenging Activity of a Novel Antioxidative Peptide Purified from Hydrolysate of Bullfrog Skin, *Rana Catesbeiana* Shaw. *Bioresour Technol*, v.99, n.6, p.1690-1698, 2008.
- RICCIARDI, B. F.; CHEQUIM, L. H.; GAMA R. R.; HASSEGAWA, L. Correção de hérnia abdominal com tela envolta por tecido fibroso - estudo em ratos Wistar. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. v.39, n.3, 2012.
- RINCÓN D. A.; SESSLER D. I.; VALERO F. Complicaciones de la hipotermia transoperatória. *Revista Colombiana Anestesiología*. v. 32, n. 3, p. 185-93, 2004.
- SARTORI, A.S.; MELLO, J. R. B. Anestesia em animais de laboratório: revisão

bibliográfica. *Veterinária em Foco*, v.15, n.2, p.19-28, 2018.

SMEAK, D.D. Abdominal Wall Reconstruction and Hernias In: JOHNSTON, S.A; TOBIAS, K.M. *Veterinary surgery small animal*. 2.ed. St. Louis: Elsevier. 2018 p.1564-1591.

VIANA, F. A. B. *Guia terapêutico Veterinário*. 2.ed. Lagoa Santa: Gráfica e Editora CEM Ltda, 2007, 444p.

VIDOR, S. B.; MARQUES, J. M. V.; MOURA, L. F. L.; GOMES, C.; PAZ, A. H.; GOMES, H. M.; MEURER L.; BARROS, R. R.; GUIMARÃES, K. M.; CIRNE-LIMA, E. O.; CONTESINI, E. A. Reparo de hérnia abdominal com pericárdio bovino associado a células-tronco mesenquimais em ratos Wistar. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.41, n.1102, p.1-10, 2013.

WILLENS S., STOSKOPF M.K., BAYNES R.E, LEWBART G.A., TAYLOR S.K., KENNEDY-STOSKOPF S. Percutaneous malathion absorption by anuran skin in flow through diffusion cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.22, n.3, p.255- 262, 2006

XU, H.; ZHANG, Y.; FENG, X; TIE, K; CAO, Y; HAN, W, Catesbeianin-1, a novel antimicrobial peptide isolated from the skin of *Lithobates catesbeianus* (American bullfrog). *Biotechnol Lett*, v.39, p.897–903, 2017.

YEO, Y.; KOHANE, D. S. Polymers in the prevention of peritoneal adhesions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, New York, v.68, p.57-66, 2008.