

# BOLETIM

REVISTA BRASILEIRA DE CIRURGIA - MAR/ABR 1983 - VOL. 73 - Nº 2

## DE CIRURGIA PLÁSTICA

CLÍNICA DE CIRURGIA PLÁSTICA E RECONSTRUTORA IVO PITANGUY



## IMPLANTE COLÁGENO NA CORREÇÃO DE DEFORMIDADES CUTÂNEAS AVALIAÇÃO PRELIMINAR

Ivo Pitanguy<sup>1</sup>  
Alberto Magno L. Caldeira<sup>2</sup>  
Carlos Alberto Affonso Ferreira<sup>3</sup>  
Mario Pelle Ceravolo<sup>3</sup>

### RESUMO

Os autores apresentam um estudo preliminar do uso clínico do bio-implante colágeno (Zyderm®) através de infiltrações no derme e/ou subderme, visando a correção de defeitos cutâneos. Selecionando 14 pacientes e realizando o tratamento em cinco casos, analisam a efetividade e inocuidade do tratamento através de seus resultados e pesquisa de extensa bibliografia.

**UNITERMOS:** colágeno; bio-implante; defeitos cutâneos

As possibilidades do uso de alo-enxertos colágenos na correção de deformidades ou alterações do relevo cutâneo foram estudadas por numerosos pesquisadores através da utilização dos mais diversos preparados, métodos ou materiais (Oliver, 1972, 1976, 1977, 1979).

Extensos estudos envolvendo grupos animais utilizando implantes colágenos, tanto na forma de auto, alo ou xeno-enxertos, comprovaram a eficácia dos últimos, quando submetidos a processos de desnaturação protéica, e proteólise seletiva de sua estrutura helicoidal, permitindo sua aplicabilidade como implante subcutâneo ou subdérmico.

Atualmente, o desenvolvimento dos métodos de seleção bioquímica e imunológica tem permitido a formação de substâncias altamente purificadas, portanto, de baixa antigenicidade. Partindo da obtenção do implante colágeno Zyderm® e elaborando uma cuidadosa avaliação clínica, introduzimos o mesmo na prática clínica ambulatorial de forma seletiva e controlada, objetivando a correção de deformidades de retração e relevo cutâneo.

O implante colágeno Zyderm é uma substância estéril, composta de colágeno dérmico bovino, altamente purificado e mantido em solução tampão-salina fosfatada contendo lidocaína a 0,31%, sendo indicado para correção de deformidades de retração e do relevo da derma. O grau do contorno dependerá da etiologia e elasticidade da lesão, da resistência tissular na área do implante e do plano tissular no qual o implante é colocado.

### PACIENTES E MÉTODOS

No período compreendido entre agosto de 1982 e fevereiro de 1983, foram selecionados 14 pacientes, conforme critérios observados na Tabela 1, cuja faixa etária disposta entre 11 a 60 anos de idade, com idade média de 38,6 anos, sendo 11 do sexo feminino e

quatro do sexo masculino. Destes apenas cinco pacientes apresentaram-se para tratamento, como pode se observar na Tabela 1.

**Caso 3** – Jovem de 13 anos de idade, portador de hemitrofia facial progressiva (síndrome de Romberg), desde dois anos de idade. Após avaliação e tratamento ortodôntico, com sensível melhora; há dois anos submeteu-se a retalho tubular dermogorduroso abdominal. Objetivando regularizar áreas deprimidas e limitadas, iniciamos tratamento através de implantações seriadas quinzenais e semanais, totalizando sete infiltrações, com um volume total de 9,5 ml. Conseguimos atenuar os defeitos nas regiões mentoniana, medialmente (2,5 cc), nasogeniana (1,5 cc) e zigomático-têmporo-frontal direitas (5,5 cc). Follow-up de 12 semanas (Figs. 1 (a, b, c, d e e), 2 (a, b e c), 3 (a, b, c, d e e), 4 (a, b, c, d e e), 5 (a, b, c, d, e e f)).

**Caso 11** – Paciente de 37 anos de idade, submetida a ritidoplastia cérvico-facial há seis meses. Desejando atenuar acentuado sulco nasogeniano, submeteu-se a duas aplicações com intervalo quinzenal, num total de 3,0 cc de implante colágeno. Follow-up de cinco semanas (Fig. 6-a, b, c, d, e e f).

- 1 Professor Titular do Curso de Especialização em Cirurgia Plástica da Escola Médica de Pós-Graduação da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Membro da Academia Nacional de Medicina
- 2 Residente da Clínica Ivo Pitanguy, Rio. Cirurgião-Residente do Curso de Especialização em Cirurgia Plástica da PUC/RJ.
- 3 Cirurgião Plástico pelo Curso de Especialização em Cirurgia Plástica da PUC/RJ

– Proibida a reprodução total ou parcial para fins comerciais

4.6.5

Tabela 1

Identificação	Idade	Sexo	Diagnóstico	Indicação
1	17	F	Hemiatrofia facial progressiva	Depressões mento, glabella, ramo mandib. E.
2	43	F	Depressão fronto-glabelar	Depressão fronto-glabelar
3	14	M	Hemiatrofia facial progressiva E.	Depressão 1/3 médio e superior mento
4	29	M	Flacidez facial	Sulco nasogeniano
5	60	F	Rugas frontoglabelares	Rugas nasogenianas e frontoglabelares
6	25	F	Cicatriz glabellar e frontal	Região glabellar e frontal
7	27	F	Seqüela abscesso reg. femoral E	Depressão 1/3 superior região femoral
8	21	M	Hemiatrofia facial E	Região mentoniana e zigomática
9	42	F	Sulco nasogeniano acentuado	Sulco nasogeniano
10	45	M	Sulco nasogeniano acentuado	Sulco nasogeniano
11	37	F	Sulco nasogeniano acentuado	Sulco nasogeniano
12	11	F	Cicatrices múltiplas reg. toracodorsal	Cicatrices deprimidas toracodorsais
13	44	F	Sulco nasogeniano acentuado	Sulco nasogeniano
14	40	F	Rugas glabellares finas	Rugas glabellares

**Caso 14** – Paciente do sexo feminino com 40 anos de idade, submetida a ritidoplastia, 30 dias antes do início da collagenoterapia. Infiltração única de 1,0 cc do bio-implante foi suficiente para a hipercorreção necessária. Follow-up de duas semanas com manutenção do efeito desejado (Fig. 7-a, b, c, d e e).

**Caso 13** – Paciente de 44 anos de idade, submetida a pequena ritidoplastia há cinco anos. Devido a discreto sulco nasogeniano, procedemos à implantação de 2,00 cc do implante colágeno, visando uma hipercorreção. Após três semanas, observamos a completa absorção do material com retorno à condição anterior (Fig. 8-a, b e c).

**Caso 1** – Paciente de 16 anos de idade, portadora de hemiatrofia facial progressiva esquerda e alopecia medial fronto-parietal. Submeteu-se a ressecção de área glabra e reparo primário, 30 dias após iniciado tratamento com implante colágeno. Procedemos a implantações com intervalos semanais, totalizando 5,5 cc nas regiões nasogeniana, mentoniana, glabellar, frontal e ramo mandibular esquerdo. O follow-up de 24 semanas comprovou a manutenção das correções realizadas.

#### Seleção de pacientes e teste

Conservado no refrigerador a uma temperatura de 8°C, evitando-se contudo seu congelamento, o implante colágeno Zyderm é apresentado em ampolas de 0,1 cc para os testes e de 1 cc para as implantações (Fig. 7-a, b, c e d).

A condição prévia para o tratamento dos pacientes é a administração de um teste de implantação no antebraço para verificar sua tolerância e reação à substância. Para este teste, é

necessária uma avaliação inicial através de uma história clínica completa, visando determinar as condições que possam influenciar com relação ao êxito do tratamento (Fig. 10-a, b, c e d).

Após verificar a inexistência de contra-indicações, o teste de implante foi realizado para garantir que o paciente não apresentava alergia preexistente. Após assepsia do local da superfície interna do antebraço, aplicamos 0,1 ml na região intradérmica ou subdérmica. Os resultados do teste foram cuidadosamente observados por um período de quatro semanas antes do início da correção, os pacientes sendo instruídos para que notificassem quaisquer reações observadas durante estas quatro semanas.

Qualquer resposta ao teste contra-indicaria o tratamento, sendo que não foi constatada nenhuma nesta série de pacientes apresentados.

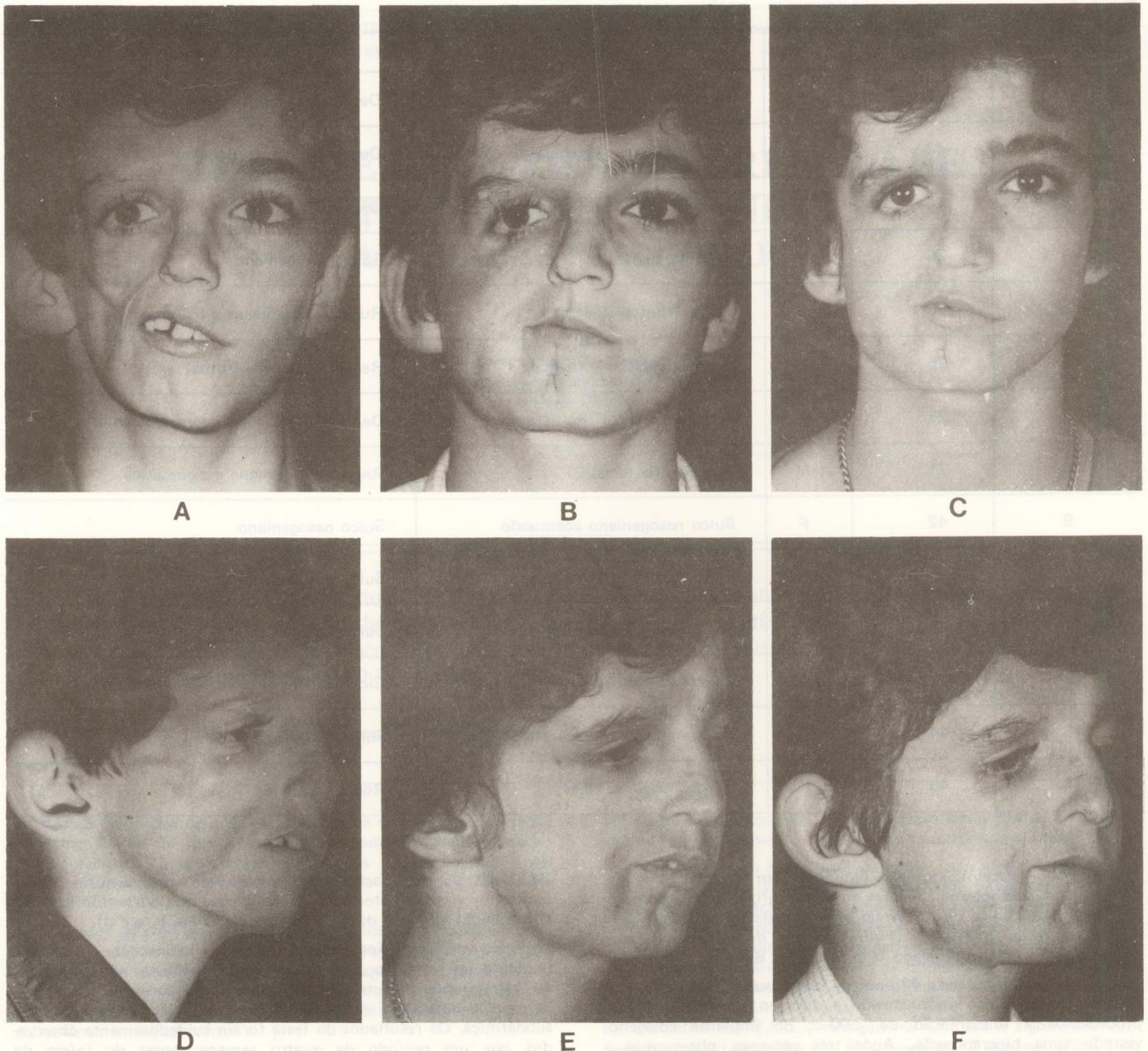
Respostas ao teste, tais como aumento de eritema, induração, amolecimento ou edema, com ou sem prurido, persistentes por mais de 6 horas, ou surgindo após 24 horas da implantação, e/ou rash, artralgia ou mialgia contra-indicariam o tratamento posterior com o implante colágeno Zyderm.

Procedemos, então, à implantação corretiva, da forma abaixo relatada:

1. Caracterização das lesões e determinação das áreas a serem tratadas. Fotografia pré-tratamento.

2. Assepsia local

3. Implantação de implante colágeno com agulha de calibre fino, introduzida no plano intradérmico, o mais superficialmente possível, e correção da lesão 1,5 a 2,0 vezes de sua profundidade inicial.



**Fig. 1 -** (Caso 3). Paciente portador de hemiatrofia facial progressiva direita desde os dois anos de idade. Submetido a tratamento cirúrgico com retalho tubular dermo-gorduroso abdominal aos 11 anos de idade. Fotos de pré-operatório e de sete e 11 meses de pós-operatório.

(Case 3). Patient with right progressive facial hemiatrophy since 2 years of age. At 11 years of age, she underwent surgical treatment that consisted of an abdominal dermal fat tubular flap. Pre-operative view, and 7 and 11 months post-operative aspect.

4. A obstrução ou qualquer dano nas agulhas durante a sessão do tratamento exige sua substituição imediata.

5. Implantações seriadas com intervalos de duas semanas são geralmente necessárias para a obtenção do nível de correção desejado.

6. O paciente é orientado para que informe qualquer anormalidade ocorrendo no local de implantação ou anormalidade sistêmica.

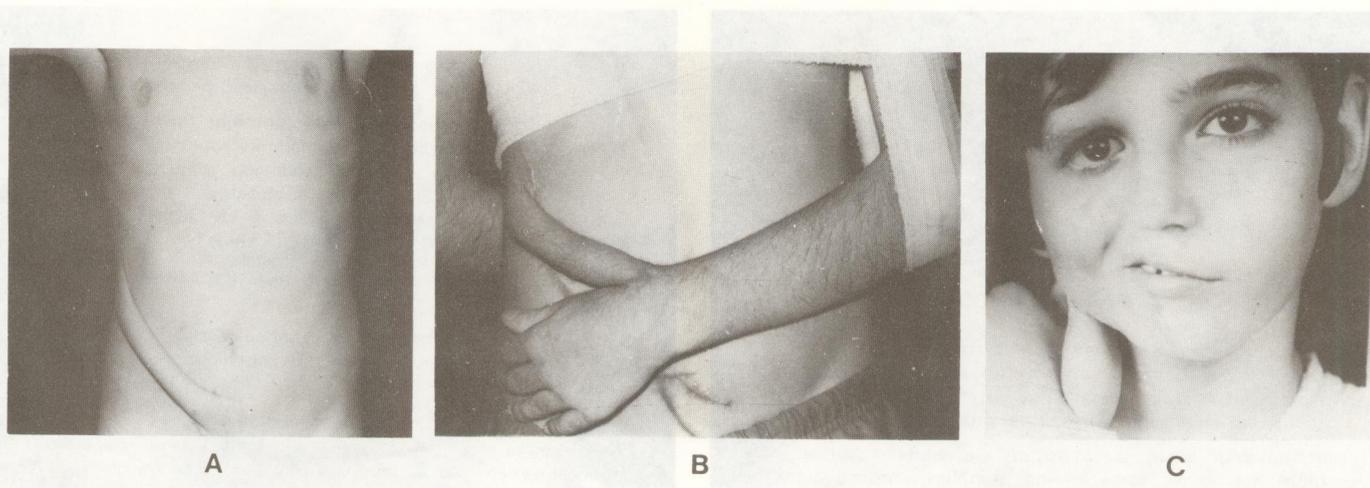
7. O material usado deverá ser descartável.

8. Fotografias do local tratado são feitas imediatamente após a aplicação, 15 e 30 dias mais tarde.

Sendo o seu emprego indicado para variadas partes do corpo assim como para diferentes tipos de lesão nos tecidos moles, os diagnósticos e as lesões corrigidas foram reunidos na Tabela 2.

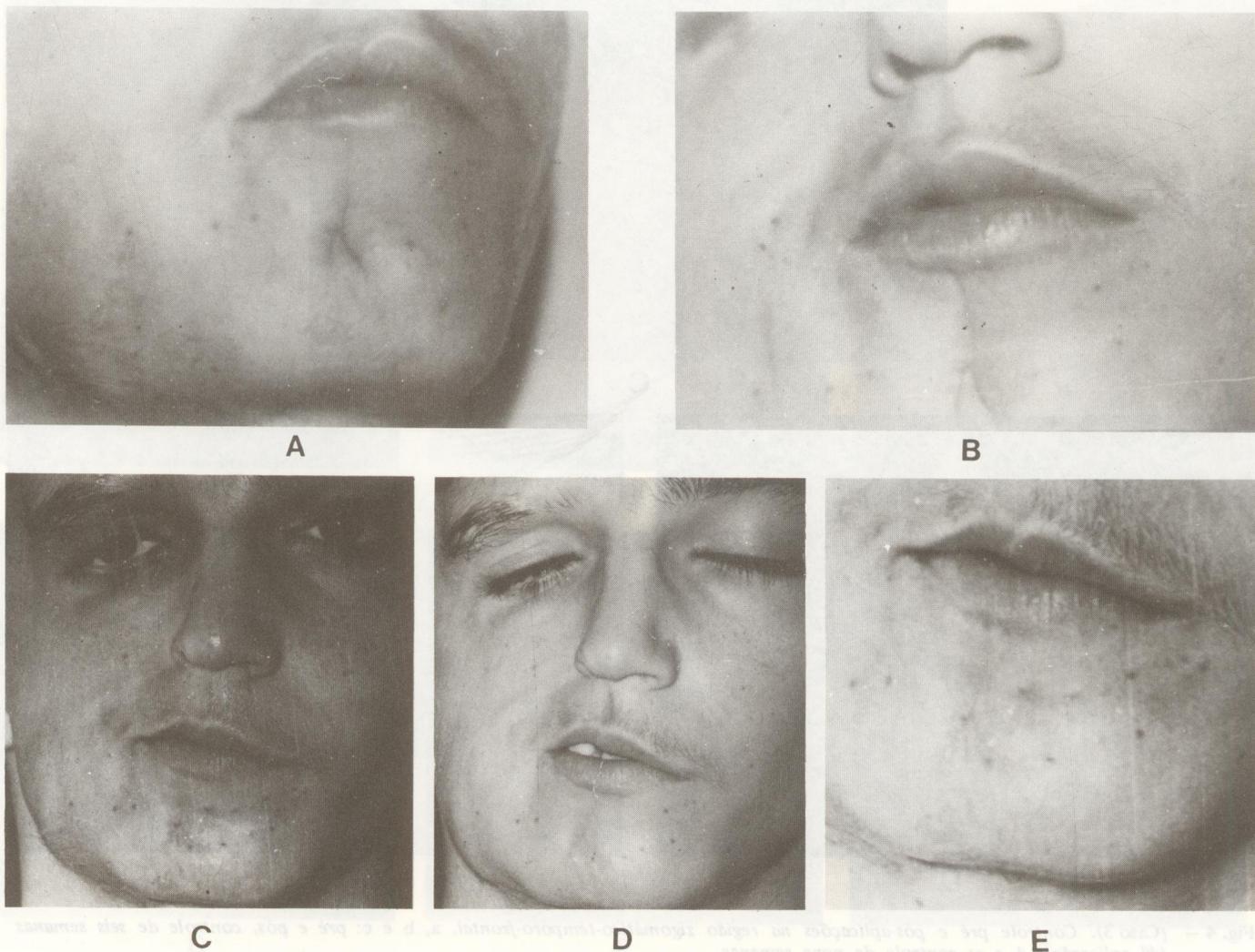
Como as regiões peri-orbitária e perilabial são áreas de pouca resistência e susceptíveis a correção excessiva e prolongada, evitamos distender estas áreas numa hipercorreção.

Lesões com resistência ou impossibilidade de distensão devido a extensão da cicatriz ou na presença de tecido não-elástico,



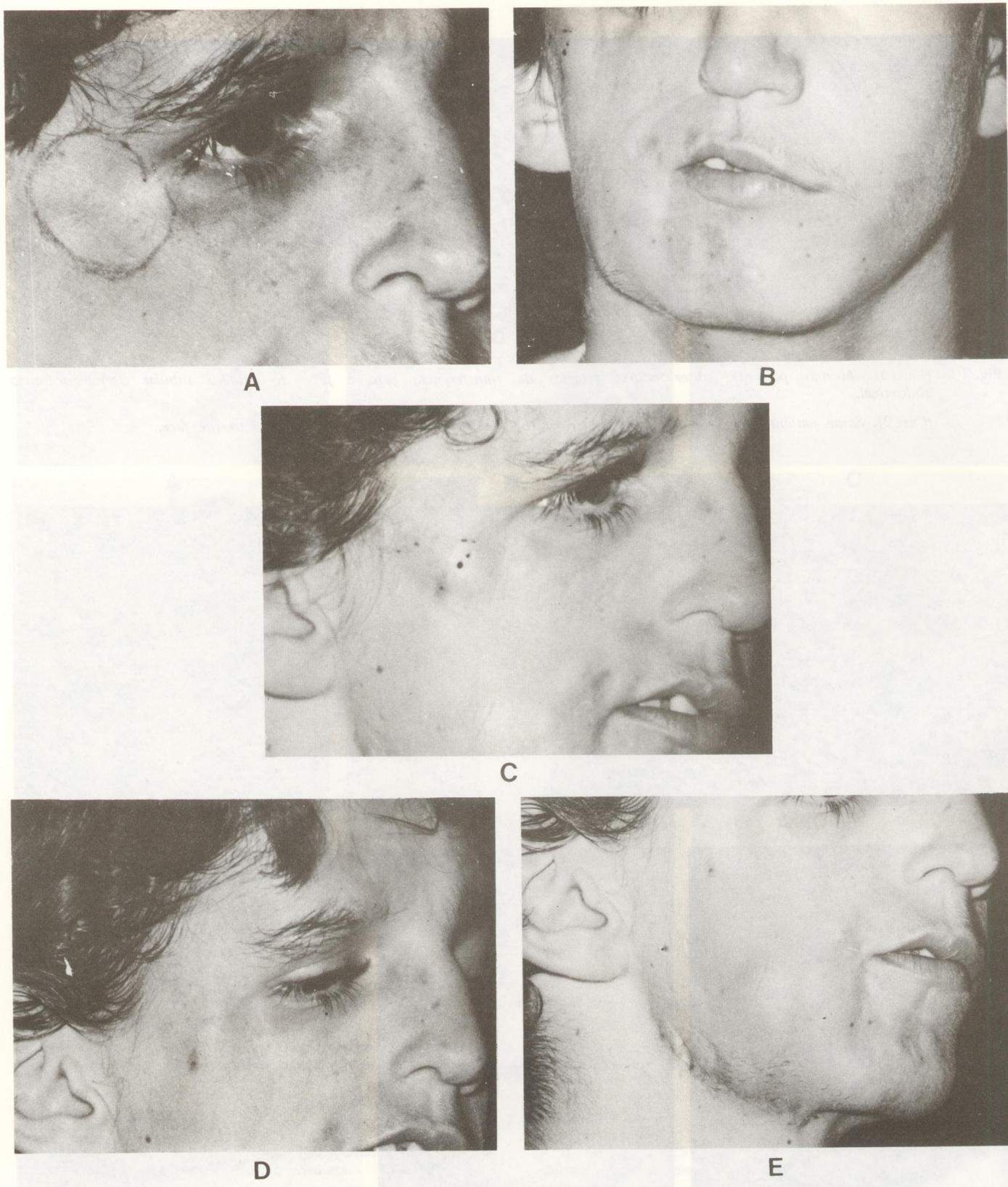
**Fig. 2 -** (Caso 3). Mesmo paciente, observando-se estágios da transferência para a face do retalho tubular dermo-gorduroso abdominal.

(Case 3). Same patient, stages of the transference of the abdominal dermal fat tubular flap to the face.



**Fig. 3 -** (Caso 3). Fotos pré e pós-colagenoterapia na região mentoniana, medialmente. a, b: fotos pré e pós (1ª aplicação); c, d e e: fotos pré e pós, controle de quatro semanas (3ª aplicação).

(Case 3). Before and after collagenotherapy on the mental area, medially. a and b: before and after photos (1st application); c, d and e: before and after, 4 weeks control (3rd application).



**Fig. 4 – (Caso 3). Controle pré e pós-aplicações na região zigomático-têmporo-frontal. a, b e c: pré e pós, controle de seis semanas (4ª aplicação); d e e: controle de nove semanas.**

*(Case 3). Before and after application control, fronto-temporo-zygomatic region. a, b and c: before and after, 6-week control (4th application); d and e: 9-week control.*

exigiram maior número de sessões e um prazo mais prolongado para se atingir o nível desejado.

O volume total injetado, individualmente, variou de 9,5 cc, num paciente portador de hemiatrofia facial (Figs. 1, 2 e 3), a 1,0 cc, num paciente portador de sulco nasogeniano, sendo o primeiro paciente submetido a sete sessões com intervalo de 15 dias, com aplicações de 1 a 2 ml em cada sessão, e o último, a apenas uma sessão (Tabela 3).

Não constatamos correção excessiva ou prolongada com o uso desta técnica.

Atingido um determinado nível de correção, implantes suplementares foram antecipados (uma semana) na maioria das aplicações, para a hipercorreção.

Embora alguns autores advoguem a sua implantação em todos os planos do tecido conjuntivo, realizamos todas as aplicações a nível dérmico ou na junção derma-subderma com os resultados que apresentamos.

**Reações associadas ao tratamento**

O surgimento imediatamente após a implantação de reações tais como, edema, hiperemia e discreto desconforto, sinais transitórios que regrediram nas primeiras 6 horas, foram relatados pelos pacientes tratados.

A persistência destas alterações ou outras alterações locais ou sistêmicas não foram observadas.

**COMENTÁRIOS**

Ao se abordar a correção de defeitos corporais através da infiltração de substâncias ou materiais aloplásticos, emerge uma seqüência de ocorrências que se estende desde a introdução de tratamentos com testes insuficientes a seqüelas desastrosas.

Substâncias vegetais ou animais, ou óleos minerais foram empregadas durante milênios por diversos povos em inúmeros campos da medicina.

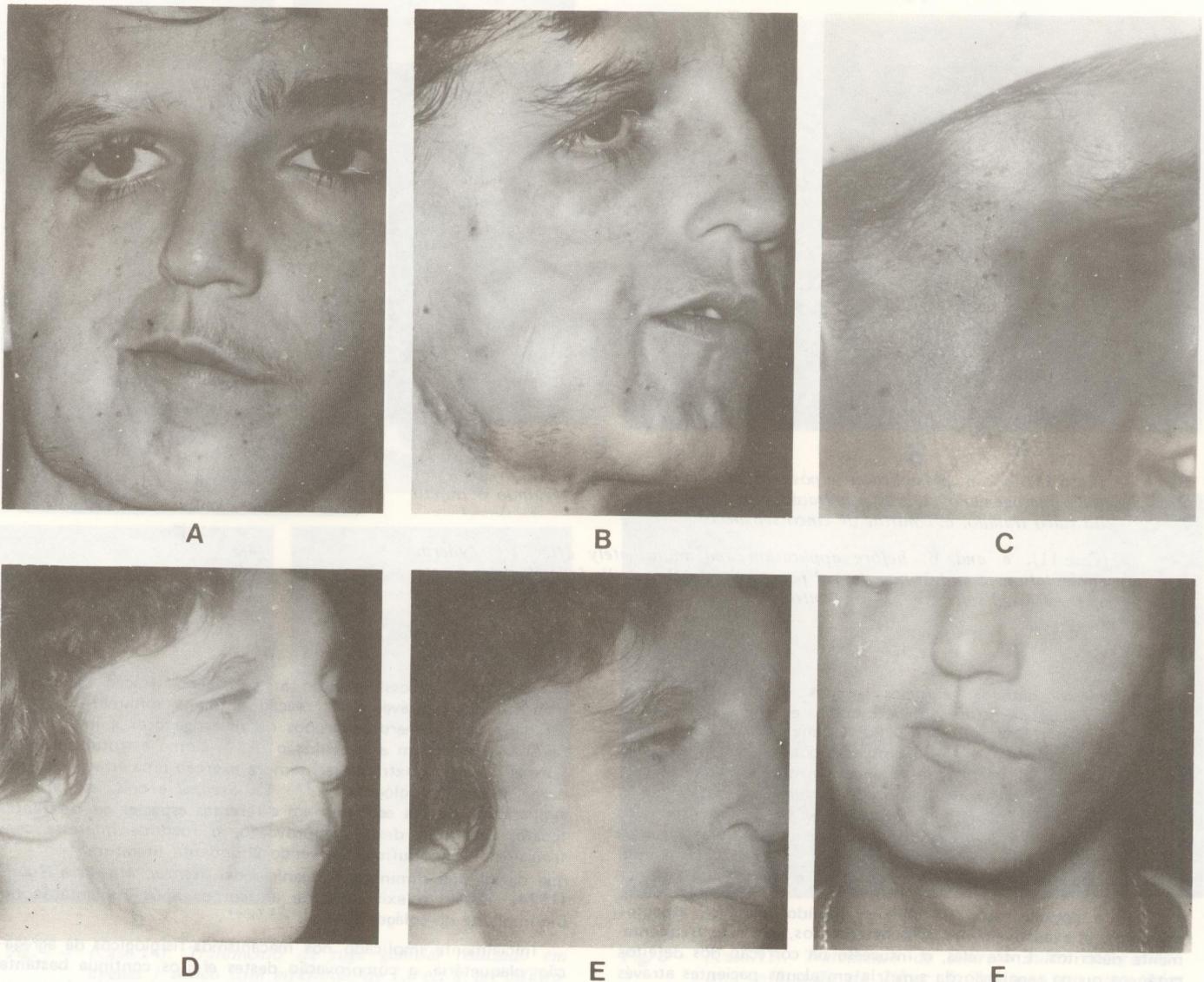


Fig. 5 - (Caso 3). a e b: controle de nove semanas; c: controle de 10 semanas; d, e e f: controle de 12 semanas, duas semanas após última sessão de aplicação.

(Case 3). a and b: 9-week control; c: 10-week control; d, e and f: 12-week control, 2 weeks after the last session.

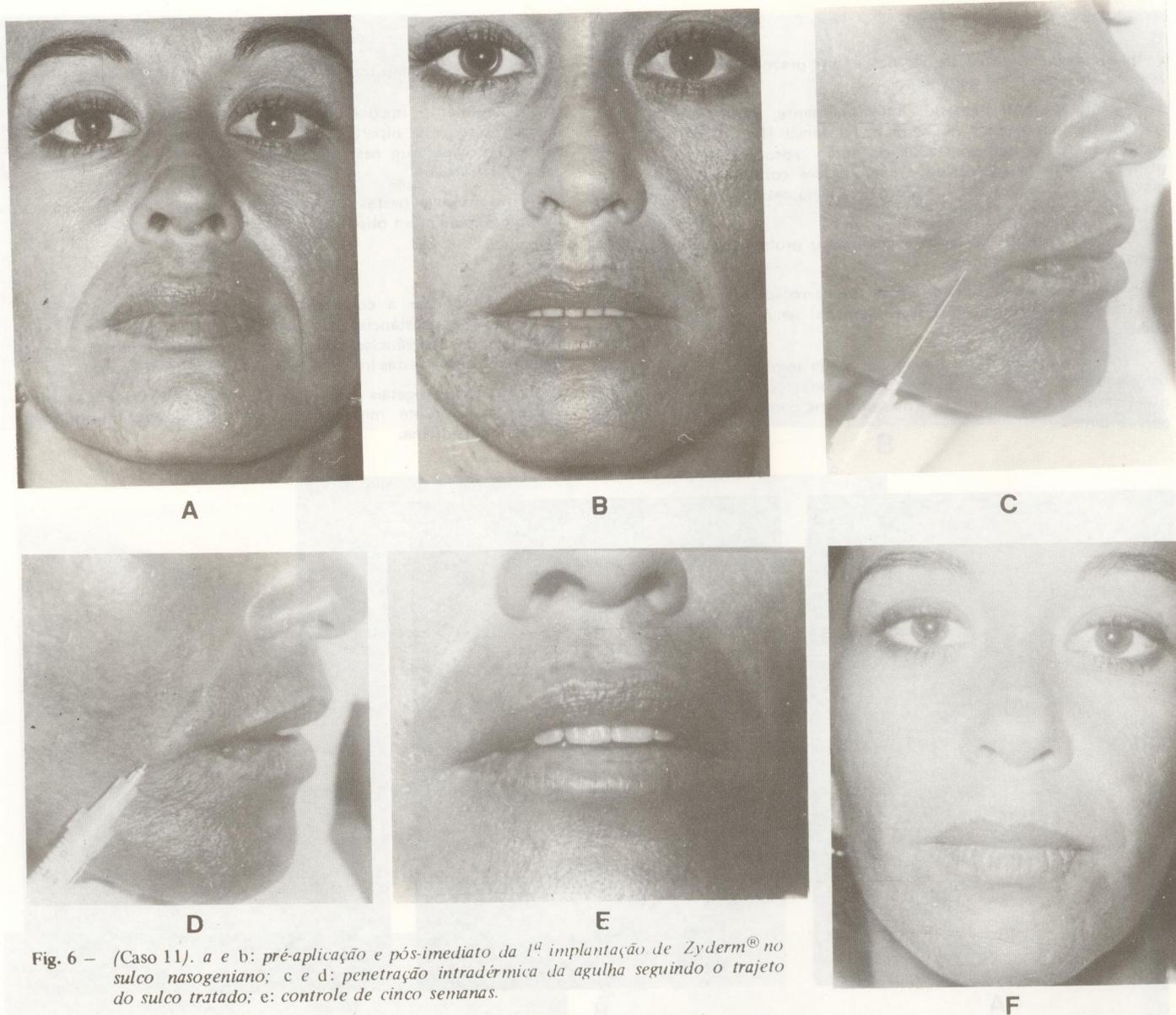


Fig. 6 - (Caso 11). a e b: pré-aplicação e pós-imediate da 1ª implantação de Zyderm® no sulco nasogeniano; c e d: penetração intradérmica da agulha seguindo o trajeto do sulco tratado; e: controle de cinco semanas.

(Case 11). a and b: before application and immediately after 1st Zyderm implantation; c and d: intradermal penetration of the needle following the course of the treated sulcus; e: 5-week control.

Sumerianos, fenícios, egípcios, gregos e romanos tinham conhecimento de numerosos óleos minerais e resinas<sup>1,6</sup>. Plínio, o velho, e Celsus referem-se ao uso do betume e da nafta. Após a descoberta da parafina, em 1830, observamos seu uso progressivo como veículo de antisséptico e no envolvimento ou hemostasia de vasos sanguíneos, até sua utilização por Gersuny e Delangre<sup>15, 16</sup>, a partir de 1899. Coube a Pfannenstiel<sup>3,2</sup> elaborar um dos primeiros trabalhos que abordou os aspectos negativos decorrentes da infiltração corporal desta substância, ao qual se seguiu brilhantes trabalhos por Kolle<sup>2,3</sup>, Boo-Chai<sup>2</sup> e outros.

Com a popularização do silicone líquido injetável, aspectos negativos, já exaustivamente consubstanciados, têm sido freqüentemente descritos. Entre eles, o insucesso na correção dos defeitos cutâneos ou na reparação da simetria em alguns pacientes através da migração para outras regiões corporais ou através de complicações, como o desenvolvimento de intensas reações inflamatórias, reabsorção óssea na área adjacente ao implante e ausência de reprodução da maciez e elasticidade<sup>5, 17, 24, 36, 42</sup>.

O colágeno é a maior proteína do tecido conectivo animal, constituindo cerca de 25% da proteína corporal total dos

vertebrados. A biossíntese do atelocolágeno (fração solúvel do tropocolágeno, estável e de reação antígena mínima) tem sido estudada por numerosos grupos de investigadores e importantes revisões comprovam esta evolução<sup>18, 41</sup>. Como estrutura protéica normal da matriz extracelular, sempre exerceu uma atração natural como implante biológico<sup>13, 21, 41</sup>. Stenzel e cols. atestaram a similaridade de sua estrutura em diferentes espécies em diferentes tecidos. Partindo desta comprovação, o foco de interesse centrou-se na imunoquímica, havendo abundante literatura<sup>13, 28, 41</sup> que define sua diminuta antigenicidade. Stenzel, Miyata e Rubin (1974) negam a existência de anticorpos após implantação do bio-implante de colágeno<sup>3, 4, 13, 17, 21</sup>.

Inicialmente implicado nos mecanismos fisiológicos de agregação plaquetária, a comprovação destes efeitos continua bastante questionável, visto a natureza deste biomaterial enzimaticamente tratado e desnaturado<sup>4, 6, 10</sup>.

O uso do colágeno como material de sutura<sup>3,3</sup>, de enxertia<sup>3,7</sup>, como válvulas cardíacas e esponjas tem sido freqüentemente relatado e proposto desde os estudos pioneiros de Schmitt e cols. durante a 2ª Guerra Mundial<sup>9, 10, 20, 35, 40</sup>.

Foram feitas numerosas tentativas quanto a viabilidade dos alo-enxertos dérmicos de células livres<sup>29, 30, 31, 33, 34</sup> nos últimos 10 anos.

Inúmeras dificuldades tanto no preparo quanto na obtenção das fontes ideais e no estudo do metabolismo das substâncias empregadas foram observadas, precedendo a síntese deste material e do método que ora empregamos<sup>30</sup>.

O implante colágeno Zyderm<sup>®</sup> por nós utilizado é constituído de colágeno dérmico bovino altamente purificado, estéril, sendo

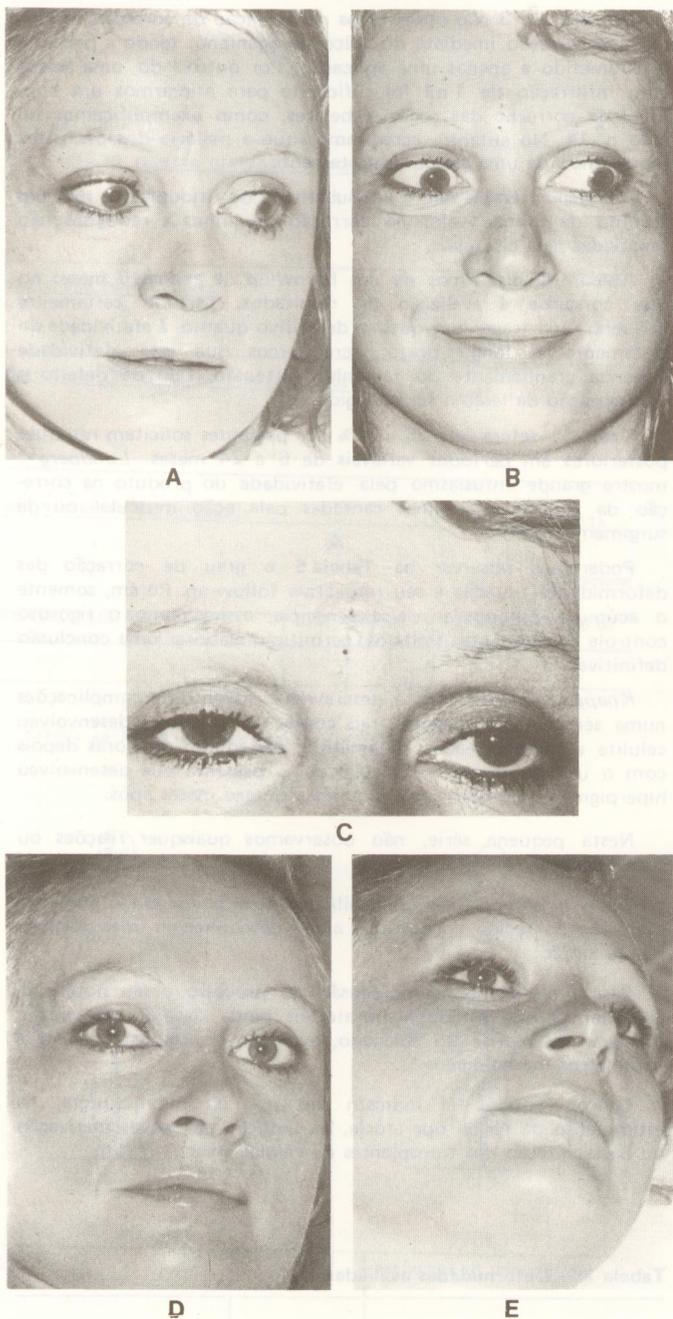


Fig. 7 – (Caso 14). Tratamento de ruga glabellar realizado em apenas 1 sessão com infiltração de 1,0 cc. a: pré-infiltração; b e c: pós-aplicação imediata; d e e: controle de duas semanas.

(Case 14). Glabellar wrinkle treated in one session with a 1.0 cc infiltration. a: before infiltration; b and c: immediately after application; d and e: 2-week control

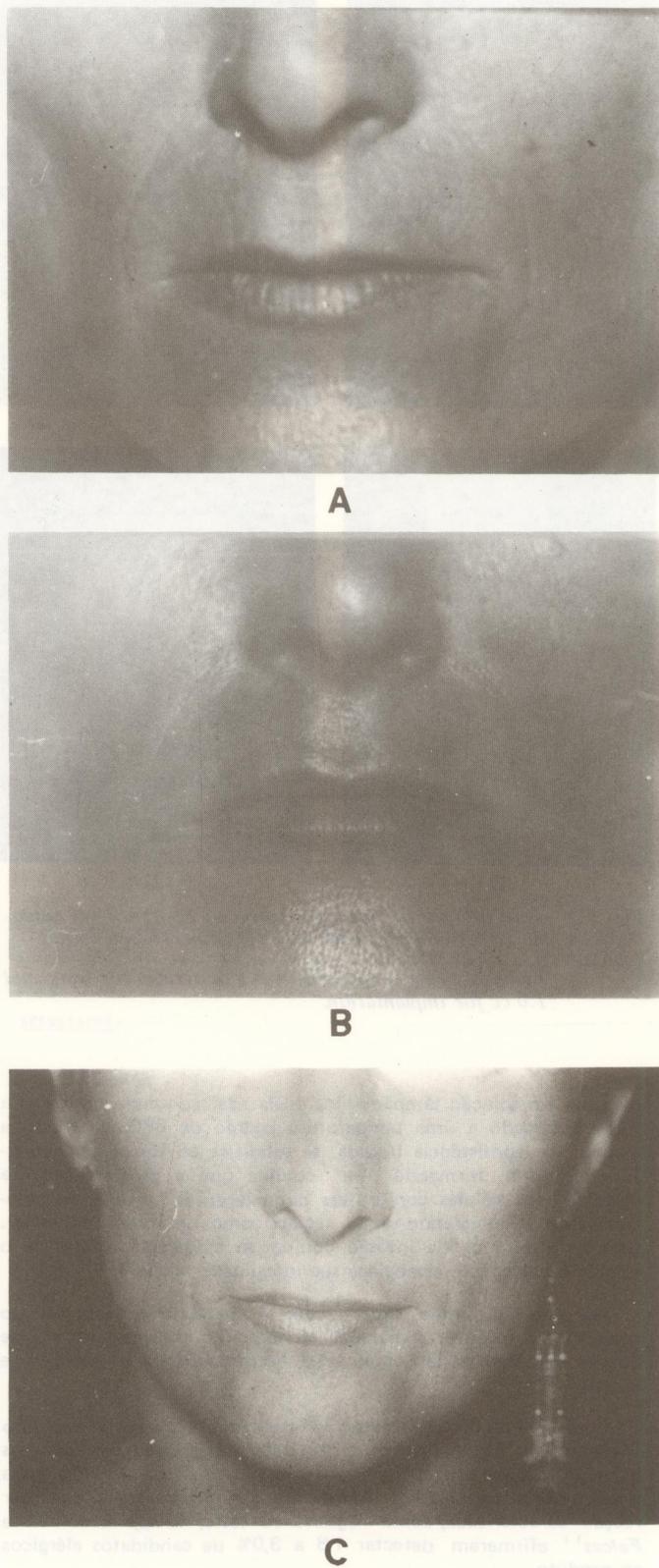


Fig. 8 – (Caso 13). Tratamento de discreto sulco nasogeniano com infiltração de 2,0 cc do colágeno em uma única sessão. a: pré-tratamento; b: pós-tratamento imediato; c: controle de três semanas.

(Case 13). Treatment of discreet nasogenian sulcus with a 2.0 cc single collagen infiltration. a: before treatment; b: immediately after treatment; c: 3-week control.

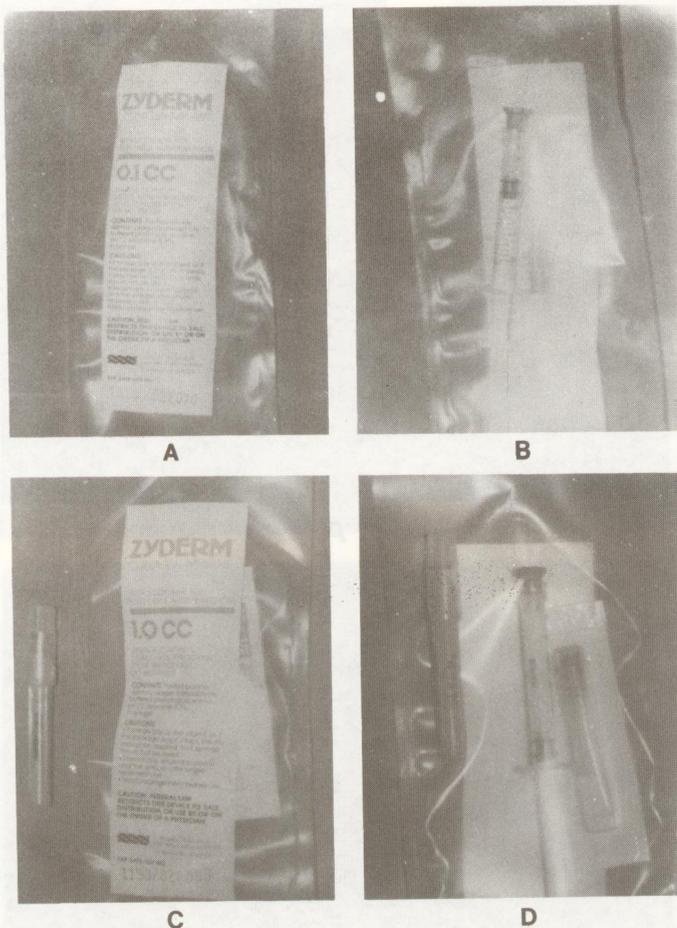


Fig. 9 – Apresentação do implante colágeno Zyderm<sup>®</sup> em ampolas de 0,1 cc para testes e de 1,0 cc para implantação.

Zyderm collagen implant in 0.1 cc syringe for tests, and 1.0 cc for implantation.

mantido em solução tampão-salina fosfatada, contendo lidocaína a 0,3%. Estocado a uma temperatura padrão de 8°C, de modo a manter sua consistência líquida, se solidifica ao tomar a temperatura corporal, formando um colóide que é progressivamente invadido por células conjuntivas circunjacentes<sup>21</sup>, sendo neovascularizado e integrando-se ao tecido como um todo indivisível. Esta característica de invasão conjuntiva e vascular diferencia o implante colágeno e estabelece sua inocuidade tecidual<sup>14</sup>.

No entanto, como ocorre com o metabolismo normal do colágeno, a resposta individual ao implante colágeno variará de acordo com fatores tais como sexo, hereditariedade, estado geral e outros<sup>7, 25, 26</sup>.

Com indicações criteriosas e definidas quanto a seu uso (Tabelas 4 e 5), realizamos o teste de implantação em todos os pacientes, aguardando um período de quatro semanas para iniciarmos o tratamento. Apesar de não observarmos qualquer reação caracterizada, como negativa ao teste, Knapp e cols.<sup>22</sup> e Falces<sup>11</sup> afirmaram detectar 1,8 a 3,0% de candidatos alérgicos ao produto.

A classificação e o diagnóstico preciso das lesões e defeitos cutâneos devem se basear na etiologia, elasticidade, resistência local e profundidade da lesão. Alguns autores classificam ainda os defeitos cutâneos, como intradérmicos, imediatamente subdérmicos, subcutâneos, além de observarem a distensibilidade e textura cutânea, a fim de manterem sob controle as aplicações e correções progressivas.

Consideramos que a suspensão colágena deva ser injetada na derme, pois mimetizará melhor o tecido circunjacente, além de possibilitar melhor correção com menor dosagem do medicamento. Devido à alta diluição em solução salina, observamos ser necessário hiper corrigir as lesões, em torno de 200%, distendendo a pele lenta e progressivamente, de forma a realizar uma protuberância temporária. Isto se faz necessário devido ao fato que a reabsorção da solução salina e da lidocaína associada determinam um retorno precoce à condição anterior. O seu alto conteúdo em água constitui, assim, na maior limitação da injeção colágena, relativa ao implante final condensado.

No caso n.º 13 não observamos manutenção da correção, apesar da hiper correção imediata do sulco nasogeniano, tendo a paciente se submetido a apenas uma aplicação. Por outro lado, uma sessão com infiltração de 1 ml foi suficiente para atingirmos um bom nível de correção das rugas glabellares, como exemplificamos no caso n.º 14. No entanto, acreditamos que a maioria dos pacientes requer mais de uma sessão de tratamento.

A colagenoterapia não é um substituto da ritidoplastia, mas um adjunto de grande valor na correção de linhas e retrações não removidas pela cirurgia.

Apesar de dispormos de um follow-up de apenas 6 meses no que concerne à avaliação de resultados, período certamente pequeno, e o traçar um quadro definitivo quanto à efetividade do tratamento a longo prazo, acreditamos que esta efetividade dependa grandemente do tamanho, extensão, tipo do defeito e configuração da lesão a ser corrigida.

Knapp<sup>22</sup> refere que 25 a 50% dos pacientes solicitam retoques posteriores em períodos variáveis de 6 a 24 meses. Lundberg<sup>25</sup> mostra grande entusiasmo pela efetividade do produto na correção da maioria das linhas cansadas pela ação muscular ou de surgimento recente.

Poderemos observar na Tabela 5 o grau de correção das deformidades tratadas e seu respectivo follow-up. Porém, somente o acúmulo progressivo de experiência, assim como o rigoroso controle dos pacientes tratados, permitirão elaborar uma conclusão definitiva.

Knapp, Kaplan e cols.<sup>22</sup> descrevem o advento de complicações numa série de 28 pacientes, tais como: um caso que desenvolveu celulite e intensa reação eritematosa, regredindo 48 horas depois com o uso de antibioticoterapia; outro paciente que desenvolveu hiperpigmentação com regressão três a quatro meses após.

Nesta pequena série, não observamos quaisquer reações ou complicações.

Todo o potencial de aplicabilidade clínica visando o aumento biológico do tecido conectivo é ainda desconhecido, mas possivelmente amplo.

Para uma melhor compreensão do processo e seu potencial, acreditamos que estudos laboratoriais ainda deverão explorar o turnover da matriz do colágeno, evolução da resposta celular e parâmetros imunológicos.

Outros estudos já indicam seu uso na microcirurgia, na estimulação da ferida operatória, na indução da neovascularização ou na facilitação dos transplantes de células vivas.

Tabela 2 – Deformidades avaliadas

Hemiatrofia facial	3
Rugas glabellares	3
Sulco nasogeniano	6
Cicatriz facial	1
Cicatriz reg. femoral	1
Seqüela varíola	1

## Observação clínica com Zyderm – Schering Corporation

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE		IDADE	Nº DO PACIENTE	SEXO	DATA DE NASCIMENTO
				M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	__/__/__
PFSO	ALTURA	PROFISSÃO	DATA INÍCIO ESTUDO	NOME/CÓDIGO DO PRODUTO	

HISTÓRIA DA LESÃO:

DESCRIÇÃO DA LESÃO:

MEDICAÇÃO OU TÉCNICA CIRÚRGICA ANTERIOR:

MEDICAÇÃO CONCOMITANTE:

RESULTADO DO TESTE DE SENSIBILIDADE:

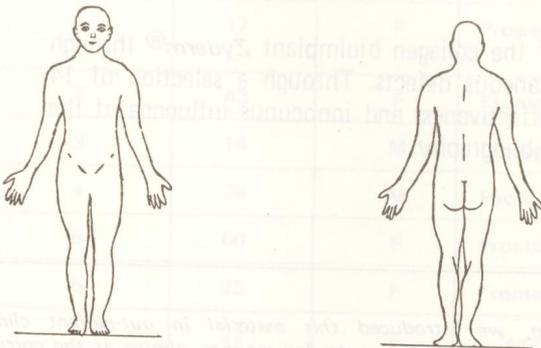
ASSINATURA DO INVESTIGADOR

DATA

A

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE		IDADE	Nº DO PACIENTE	NOME OU CÓDIGO DO PRODUTO	DATA-INÍCIO

MARQUE AS ÁREAS A SEREM CORRIGIDAS:



OBSERVAÇÕES:

ASSINATURA DO INVESTIGADOR

DATA

B

TÉCNICA E VOLUME APLICADO:

SINAIS E SINTOMAS LOCAIS APÓS A APLICAÇÃO (ATÉ 48 HORAS):

EFEITOS COLATERAIS SISTÊMICOS:

SIM  (RELATAR)

NÃO

OBSERVAÇÕES:

ASSINATURA DO INVESTIGADOR

DATA

C

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE		IDADE	Nº DO PACIENTE	NOME OU CÓDIGO DO PRODUTO	DATA-INÍCIO

RESULTADOS:

- APÓS 5 DIAS:

- APÓS 15 DIAS:

- APÓS 30 DIAS:

- APÓS 60 DIAS:

- AVALIAÇÃO FINAL APÓS 90 DIAS:

ASSINATURA DO INVESTIGADOR

DATA

D

Fig. 10 – Utilizamos o questionário acima para controle do tratamento, visando determinar as condições que possam influenciar quanto ao êxito do tratamento.

Questionnaire for treatment control, to determine the conditions which could influence the success of the treatment.

Tabela 3 – Casuística e follow-up

Identificação	Nº de aplicações	Vol. (ml)	Grau correção	Follow-up (semanas)
3	7	9,5	60 – 90%	12
11	2	3,0	60 – 90%	5
14	1	1,0	90 – 100%	2
13	1	2,0	Nenhum	3
1	5	6,5	90 – 100%	24

## CONCLUSÃO

A aplicação do implante colágeno intradérmico, sem dúvida constitui uma grande vantagem que permite a reposição de certos defeitos que, por serem pequenos, não poderiam ser corrigidos através de cirurgia.

Além disso, é um importante elemento do tratamento de pequenos defeitos decorrentes de algumas cirurgias corretivas.

Apesar do baixo índice de reação ou sensibilização, a realização do teste de implante previamente ao uso do produto deve permanecer como condição *sine qua non*.

A adição de um anestésico ao produto permite boa tolerância por parte do paciente.

Situando-se como um estudo preliminar, é fundamental que uma casuística maior e um período de follow-up mais longo sejam observados, a fim de que possamos estabelecer uma melhor sistematização de seu uso clínico.

Tabela 4 – Indicações

1. Cicatrizes retráteis pós-acne
2. Atrofia por traumatismo ou patologia
3. Irregularidades pós-rinoplastia
4. Sulcos nasolabiais
5. Enxertos cutâneos
6. Outras irregularidades pós-cirúrgicas
7. Rugas fronto-glabelares ou frontais
8. Outros defeitos nos tecidos moles

Tabela 5 – Contra-indicações

1. Pacientes com história pessoal ou familiar de doença auto-imune, artrite reumatóide, artrite psoriática, lupus eritematoso sistêmico, dermatomiosite, polimiosite, tireoidite de Hashimoto, doença de Graves, poliartrite nodosa, esclerose sistêmica progressiva (escleroderma), colite ulcerativa, doença de Crohn, síndrome de Reiter, doenças mistas do tecido conjuntivo.
2. História de reações anafiláticas
3. Pacientes sensíveis à lidocaína
4. Recém-natos e crianças abaixo de 11 anos de idade
5. Aumento do volume mamário
6. Implante em osso, tendão, ligamentos ou músculos
7. Pacientes grávidas
8. Pacientes que fizeram uso de silicone ou outras substâncias líquidas para aumento de tecidos moles
9. Pacientes portadores de processos inflamatórios ativos.

## Collagen implant for correction of cutaneous deformities Preliminary evaluation

## SUMMARY

The authors present a preliminary study on the clinical use of the collagen bioimplant *Zyderm*<sup>®</sup> through dermal and/or subdermal infiltrations, aiming at correcting cutaneous defects. Through a selection of 14 patients and treatment of 5 of them, the authors analyze the effectiveness and innocuous influence of the treatment through the results obtained and research of extensive bibliography.

UNITERMS: collagen; bioimplant; cutaneous defects

*The possibilities related to the use of collagen allografts for correction of deformities and alterations of the soft tissue contour were studied by innumerable researchers by means of the use of variable substances, methods and materials (Oliver, 1972, 1976, 1977, 1979).*

*Extensive studies involving experimental animals in which collagen implants in auto, alo and xenografts forms were used, proved the effectiveness of the last when submitted to proteic denaturation and to a selective proteolysis of its helicoidal structure, allowing for its applicability as a subcutaneous or subdermal implant.*

*The development of methods of biochemical and immunologic selection presently allows for the formation of highly purified substances, therefore, of low antigenicity. From the obtention of the collagen implant *Zyderm*<sup>®</sup> and by developing a careful clinical*

*evaluation, we introduced this material in out-patient clinic through a selective and controlled manner, aiming at the correction of retracted and soft-tissue contour deformities.*

*The *Zyderm*<sup>®</sup> collagen implant is a sterile substance, of bovine skin collagen, highly purified and maintained in physiological buffers solution containing 0,31% lidocaine, being indicated for correction of retracted and soft-tissue contour deformities. The degree of the contour will depend on the etiology and elasticity of the lesion, of the tissular resistance at the site of implantation and of the tissular level in which the implant is placed.*

## MATERIAL AND METHOD

*Fourteen patients were selected between August 1982 and February 1983, according to the criteria observed on Table 1.*

The age group remained between 11 and 60 years of age, with an average age of 38.6, being 11 females and 4 males. Only 5, out of the 14 patients, came for treatment, as can be observed on Table 1.

Case 3 - 13-year-old male patient, bearing a progressive facial hemiatrophy (Romberg's syndrome) since 2 years of age. After orthodontic evaluation and treatment, with good improvement; as of 2 years, he was submitted to an abdominal dermal fat tubular flap. Aiming at behaving out the depressed and limited areas, the patient was submitted to a series of implantations, weekly and with a 2-week interval, completing 7 infiltrations, with a total volume of 9.5 ml.

The defect was minimized at the mental region, medially (2.5 cc), nasogenian (1.5 cc) and right fronto-temporo-zygomatic regions (5.5 cc). Follow-up of 12 weeks (Figs. 1(a, b, c, d, e e f), 2(a, b and c), 3-a, b, c, d and e), 4(a, b, c, d and e), 5(a, b, c, d, e and f).

Case 11 - 37-year-old female patient, who underwent a cervico-facial rhytidectomy 6 months before. Wishing to minimize the nasogenian sulcus, she underwent 2 implantations with a 15-day interval, a total of 3.0 cc of collagen implantation. Follow-up of 5 weeks (Fig. 6-a, b, c, d, e and f).

Case 14 - 40-year-old female patient, who underwent a rhytidectomy 30 days prior to the collagenotherapy. A single 1.0 cc bioimplant infiltration was sufficient for the necessary overcorrection. Follow-up of 2 weeks with maintenance of the effect desired (Fig. 7-a, b, c, d and e).

Case 13 - 44-year-old female patient, who underwent a minor rhytidectomy 5 years earlier. Due to a discreet nasogenian sulcus, we conducted a 2.00 cc collagen implantation, aiming at overcorrection. The material was completely absorbed 3 weeks after the implantation, with return to the previous condition (Fig. 9-a, b and c).

Case 1 - 16-year-old female patient, with left progressive facial hemiatrophy and fronto-parietal medial alopecia. She underwent resection of the glabrous area and primary repair 30 days after starting the collagen implantation. Implantations with weekly

intervals, totalling 5.5 cc on the nasogenian, mental, glabellar, frontal and left mandibular branch regions. The 24-week follow-up evidenced maintenance of the correction performed.

**Selection of patients and test**

Stored under refrigeration at a temperature of 8°C but avoiding freezing it, the Zyderm® collagen implant is packed in 0.1 cc syringes for tests and in 1.0 cc syringes for the implantation (Fig. 9-a, b, c and d). A previous condition for treatment of patients is the administration of an implantation test on the forearm, so as to verify the tolerance and reaction to the substance. The test requires an initial evaluation through a complete clinical history, to determine the conditions that could influence the successful results of the treatment (Fig. 10-a, b, c and d). In view of no contraindications, the implantation test is done as a guarantee against patients' pre-existing allergy.

After local asepsis of the inner surface of the forearm, 0.1 ml is injected on the intradermal or subdermal region. The test results were carefully observed during a 4-week period before starting the correction, the patients being instructed to notify any reaction observed during this period.

Any adverse answer to the test would contraindicate the treatment, being that none was reported in this series of patients.

Answers to the test, such as erythema, induration, softening or oedema with or without prurigo, persisting for more than 6 hours or appearing 24 hours after the implantation, and/or rash, arthralgia or myalgia, would contraindicate posterior treatment with the Zyderm® collagen implant.

The corrective implantation proceeded, as below:

1. Qualification of the lesions and determination of the areas to be treated. Before treatment photos.
2. Local asepsis
3. Implantation of the collagen implant with a fine gauge needle introduced in the intradermal plane, as superficially as possible, and correction of the lesion 1.5 to 2.0 times over its initial depth.

Table 1

Identification	Age	Sex	Diagnosis	Indication
1	17	F	Progressive facial hemiatrophy	Chin, glabella, R mandibular branch depressions
2	43	F	Fronto-glabellar depression	Fronto-glabellar depression
3	14	M	L progressive facial hemiatrophy	Middle third and upper mental depression
4	29	M	Facial flaccidity	Nasogenian sulcus
5	60	F	Frontoglabellar wrinkles	Nasogenian and frontoglabellar wrinkles
6	25	F	Frontal and glabellar scar	Frontal and glabellar region
7	27	F	L femoral region abscess scar	Femoral region upper third depression
8	21	M	L facial hemiatrophy	Zygomatic and mental region
9	42	F	Marked nasogenian sulcus	Nasogenian sulcus
10	45	M	Marked nasogenian sulcus	Nasogenian sulcus
11	37	F	Marked nasogenian sulcus	Nasogenian sulcus
12	11	F	Multiple scars toraccodorsal region	Toraccodorsal depressed scars
13	44	F	Marked nasogenian sulcus	Nasogenian sulcus
14	40	F	Fine glabellar wrinkles	Glabellar wrinkles

4. Obstruction or any damage to the needles during the session demands its immediate substitution.

5. Serial implantations with 2-week interval are usually necessary to obtain the level of correction desired.

6. The patient is advised to report any abnormality occurring at the site of implantation or any systemic abnormality.

7. The material employed should be disposable.

8. Photos are made immediately after the application, followed by 15 and 30 days later.

As the use of Zyderm® was indicated in different parts of the body as well as in different types of soft-tissue lesions, the diagnosis and lesions corrected were grouped on Table 2.

We avoided distending the periorbital and perilabial regions with any overcorrection as these areas are less resistant and more sensitive to excessive and prolonged correction.

Lesions resistant or incapable of distention due to large scars or with a non-elastic tissue required a larger number of sessions and a longer time to reach the level desired.

The total volume injected varied from 9.5 cc, in a patient bearing facial hemiatrophy (Figs. 1, 2 and 3), to 1.0 cc, in a patient bearing nasogenian sulcus. The first patient underwent 7 sessions of 1 to 2 ml application each, with a 15-day interval, and the second one underwent one single session (Table 3).

Any excessive or prolonged correction with the use of this technique was not noticed.

When a certain level of correction was achieved, supplementary implants for overcorrection were anticipated (1 week) in most of the applications.

Although some authors advocate its implantation in all planes of the connective tissue, we carried out all applications at a dermic level or at the derma-subdermal junction.

#### Associated reactions to the treatment

Immediate reactions after implantation such as oedema, hyperemia and discreet discomfort, that receded after the first 6 hours, were reported by the patients.

Persistence of these alterations or other local systemic alterations were not observed.

#### COMMENTS

When dealing with correction of body defects by means of infiltration of aloplastic substances or materials, a sequence of occurrences emerges, from the introduction of the treatment with insufficient tests to disastrous consequences.

Vegetal or animal substances, or mineral oils were employed for centuries among various nations in different fields of medicine. Sumerians, Egyptians, Greeks and Romans were acquainted with different kinds of mineral oils and resins<sup>16</sup>. Plinius, the Old One, and Celsus refer to the use of bitumen and naphta. After discovery of the paraffin, in 1830, its progressive use as an antiseptic vehicle and in the involvement or hemostasis of blood vessels was observed, up to its utilization by Gersuny and Delangre<sup>15, 16</sup>, since 1899. Pfannenstiel<sup>32</sup> was the one to write the first papers on the negative aspects resulting from the infiltration of this substance on the body, followed by the brilliant works of Kolle<sup>23</sup>, Boo-Chai<sup>2</sup> and others.

With the wide use of injectable liquid silicone, its exhaustibly consubstantiated negative aspects have already been frequently described. Among these, the unsuccessful correction of cutaneous defects or the non-reconstruction of symmetry in some patients due to migration of the material to other parts of the body or still, the appearance of complications such as development of intense inflammatory reaction, bone resorption on areas adjacent to the implant, added to the lack of softness and elasticity reproduction<sup>5, 17, 24, 35, 42</sup>.

Table 2 – Deformities evaluated

Facial hemiatrophy	3
Glabellar wrinkles	3
Nasogenian sulcus	6
Facial scar	1
Femoral region scar	1
Sequella small-pox	1

Collagen is the major connective tissue protein in animals, accounting for about 25% of the total body protein of vertebrates. The biosynthesis of atelocollagen (solubilized fraction of the tropocollagen, stable and of minimal antigenous reaction) has been studied by many groups of investigators and important revisions prove this evolution<sup>18, 41</sup>.

Collagen as the normal structure protein of the extracellular matrix has natural attractiveness for biologic implantation<sup>13, 21, 41</sup>.

Stenzel and cols. attested to the similarity between collagen from different species and even from different tissues. Starting from this proof, interest was focused on immunochemistry, with abundant literature on the subject<sup>13, 28, 41</sup>, that defines diminute antigenicity. Stenzel, Miyata and Rubin deny the existence of antibodies after implantation of the collagen bioimplant<sup>3, 4, 13, 17, 21</sup>.

Initially implicated in the physiological mechanisms of platelet aggregation, proof of these effects are still very questionable due to the nature of this enzymatically treated and denatured biomaterial<sup>6, 10, 14</sup>.

The use of collagen as suture material<sup>33</sup>, as graft material<sup>37</sup>, as cardiac valves and sponges, has been frequently reported and proposed since the prophetic studies of Schmitt and cols. during the Second World War<sup>9, 10, 20, 35, 40</sup>.

Many tentatives were made regarding the viability of dermal alografts of free cells in the last 10 years<sup>29, 30, 31, 33, 34</sup>. Several difficulties regarding the preparation as well as the obtention of ideal sources, and the study of the metabolism of the substances employed were encountered, preceding the synthesis of this material and method which we now employ<sup>30</sup>.

The Zyderm® collagen implant we use is a bovine skin collagen highly purified, sterile, kept in physiological buffers, containing 0.3% lidocaine. It is stored at a standard temperature of 8°C, so as to maintain its liquid form, solidifying at body temperature, forming a coloid which is progressively invaded by circumjacent connective cells<sup>21</sup>, being neo-vascularized and integrating the connective tissue as an indivisible whole. This characteristic connective and vascular invasion differentiates the collagen implant and establishes its tecidual innocuity<sup>14</sup>. However, as in collagen normal metabolism, the individual response to the collagen implant will vary according to factors such as sex, heredity, general conditions and other<sup>7, 25, 26</sup>.

With judgemental and definite indications regarding its use (Tables 4 and 5), implantation tests were made in all patients, observing a period of 4 weeks to start the treatment. Although we

Table 3 – Casuistry and follow-up

Identifi- cation	N.º of applications	Vol. (ml)	Correction degree	Follow-up (weeks)
3	7	9.5	60 – 90%	12
11	2	3.0	60 – 90 %	5
14	1	1.0	90 – 100%	2
13	1	2.0	None	3
1	5	6.5	90 – 100%	24

**Table 4 – Indications**

1. Retractable acne scarring
2. Traumatic or pathologic atrophy
3. Post-rhinoplasty irregularities
4. Nasolabial sulcus
5. Cutaneous grafts
6. Other post-operative irregularities
7. Frontoglabellar or frontal wrinkles
8. Other soft-tissue defects

did not account for any negative reactions to the test, Knapp and cols.<sup>2,2</sup>, and Falces<sup>11</sup> maintained that 1.8 to 3.0% of the candidates were allergic to the product.

The classification and precise diagnosis of the lesions and cutaneous defects should be based on the etiology, elasticity, local resistance and depth of the lesion. Some authors classify cutaneous defects as intradermal, immediately subdermal, subcutaneous, besides observing the distensibility and skin texture, so as to maintain the applications and progressive corrections under control.

We consider that collagen suspension should be injected in the dermis, for it will mimize better the circumjacent tissue, besides allowing for a better correction with lower dosage of the substance. Due to its high dilution in saline solution, we noted that it is necessary to overcorrect the lesions, up to 200%, distending the skin slow and progressively, so as to form a temporary bulge. This is necessary because resorption of the saline solution associated to lidocaine determines an early return to the previous condition. Therefore, the major limitation of collagen injections is its high water content, relative to the condensed final implant.

In case n.º 13, we did not observe any benefit, no maintenance of the correction, inspite of the immediate overcorrection of the nasogenian sulcos, the patient undergoing one single application. On the other hand, one 1 ml infiltration session was sufficient in case n.º 14, where a good plane of correction of the glabellar wrinkles was achieved.

Nonetheless, we believe that most patients need more than one treatment session.

Collagenotherapy does not substitute rhytidectomy, but is an adjunct of great value for correcting lines and retractions not removed by the surgery.

**Table 5 – Contra-indications**

1. Patients with personal or familial history of auto-immune disease, rheumatoid psoriatic arthritis, systemic lupus erythematosus, dermatomyositis, polimyositis, Hashimoto's thyroiditis, Graves's disease, polyarthritis nodosa, progressive systemic sclerosis (scleroderma), ulcerative colitis, Crohn's disease, Sjögren's syndrome, Reiter's syndrome, mixed diseases of the connective tissue.
2. History of anaphylaxis reaction
3. Patients sensitive to lidocaine
4. Newborns and children under 11 years of age
5. Increase of breast volume
6. Bone, tendon, ligament or muscle implant
7. Pregnant patients
8. Patients previously injected with silicone or other liquid substances for increase of soft-tissues
9. Patients presenting an active inflammatory process

With a follow-up of only 6 months (which is certainly a very short period) regarding the evaluation of the results and also in relation to the composition of a definite picture of effectiveness of the treatment at long term, we nevertheless believe that this effectiveness largely depends on the size, extension, type of defect and evaluation of the lesion to be corrected.

Knapp<sup>2,2</sup> refers that 25 to 50% of the patients wished for a posterior retouch, in periods that varied from 6 to 24 months. Lundberg<sup>2,5</sup> showed great enthusiasm for the effectiveness of the product in relation to the correction of the majority of tired lines due to muscular action or of recent appearance.

The degree of correction of the deformities treated, as well as their follow-up, can be seen on Table 5. Nevertheless, only the progressive accumulation of experience as well as the strict control of patients treated will allow for a definite conclusion. Knapp, Kaplan and cols.<sup>2,2</sup> describe complications in a series of 28 patients, such as: 1 patient developed cellulitis with intense erythematous reaction, receding in 48 hours after antibioticotherapy; another patient developed an hyperpigmented area, which resolved 3-4 months later.

We did not observe any reactions or complications in our small series.

The full potential of clinical application for a biological augmentation of connective tissue is unknown, but possibly large. To better understand the process and its potential, current laboratory studies are under way to explore the rate of turnover of the collagen matrix, the evolution of the cellular response and the details of the immunological parameters.

Other studies already indicate its use in microsurgery, on wound healing in surgical incisions, on inducement of neovascularization and on facilitation of live cellular transplants.

#### CONCLUSIONS

The use of the intradermal collagen implant constitutes, without doubt, a large advantage that allows reposition of certain defects which, being small, cannot be corrected through an operation. It is also an important element for treatment of small defects derived from certain corrective operations.

Inspite of the small rate of reaction or sensibilization, the implant test previous to the use of the product should remain as a condition sine qua non.

The association of an anaesthetic to the product allows good tolerance of the patient.

Considered as a preliminary study, it is fundamental that a larger casuistry and a longer follow-up period be observed so that we may establish a better systematization of its clinical use.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APARRAY MB & TANNER JC Jr. – Surg Forum, 20: 483-86, 1969.
2. BOO-CHAI K – Paraffinoma. Plast Reconstr Surg, 36: 101, 1965.
3. BRAUN RM – Comparative study of neuroorrhaphy and sutureless peripheral nerve repair. Surg Gyn Obst, 122: 15-18, 1966.
4. BRUNNER H, DICHTL M & STEFFEN CZ – Immunol Forsch, 141: 460-70, 1971.
5. BULCÃO DE MORAES H – Liquid silicone in the dorsum of the hand. Ann Plast Surg, 6: 500-2, 1981.
6. CALAHAN A – Arch Ophthalmol, 73: 800-2, 1965.
7. CONVERSE JM – Experimental human skin allografts. The HLA complex and a Nobel prize. Plast Reconstr Surg, 70: 255-61, 1982.

8. DELANGRE M - De la prothèse chirurgicale réalisée par l'inclusion de la vaseline stérilisée dans le tissu. Bull Acad Royale Bel, 15: 264, 1901.
9. DUNN MW et alii - Arch Ophthalmol, 82: 840-44, 1969.
10. DUNN MW et alii - Trans Am Soc Artif Int Organs, 17: 421-23, 1971.
11. FALCES E - Collagen injections give smoothing lift to wrinkles and depressed scars. Med World News, 1981.
12. FURTHMAYR H & TRUMPL R - Immunochemistry of collagens and procollagens. Internat Rev Connective Tissue Res, 7: 61, 1976.
13. GALLOP PM, BLUMENFELD OO & FEIFTER S - Structure and metabolism of connective tissue proteins. Ann Rev Biochem, 41: 617, 1972.
14. GRAY S & MILLER J - Collagen in the physiology and pathology of connective tissue. Ed. Gustav Fischer, N.Y., 1978.
15. GERSUNY R - Uber eine subcutane prothese. Zeitschrift f. Heilkunde, Wien v. Leipzig, 21: 199, 1900.
16. GOLDWYN RM - The paraffin story. Plast Reconstr Surg, 65: 517-24, 1980.
17. GOULIAN D Jr. - Current status of liquid injectable silicone. Aesth Plast Surg, 2: 247-250, 1978.
18. GRANT ME & PROCKOP DJ - New England J Med, 286: 194-99, 242-49, 291-300, 1972.
19. HUNT TK - Disorders of repair and their management. In: Fundamentals of wound management (Ed. T.K. Hunt e T.E. Dumphy). Appleton Century Crofts, New York, pp. 68-168, 1978.
20. KLINE DG - Arch Surg, 91: 924-29, 1965.
21. KNAPP, TERRY R, LUCK E & DANIELS JR - Behavior of solubilized collagen as a bioimplant. J Surg Research, 23: 96-105, 1977.
22. KNAPP TR, KAPLAN EN & DANIELS JR - Injectable collagen for soft tissue augmentation. Plast Reconstr Surg, 60: 398-405, 1977.
23. KOLLE FS - Plastic and Cosmetic Surgery, Appleton Century Crofts, N.Y., pp. 209-338, 1911.
24. LASH H et alii - Custom-fabricated silicone implants for contour restoration. Ann Plast Surg, 2: 97-102, 1979.
25. LUNDBERG C, CAMPBELL D, AGENRUP B & ULFENDAHL H - Quantification of the inflammatory reaction and collagen accumulation in an experimental model of open wounds in the rat (A methodological study). Scand J Plast Reconstr Surg, 16: 123-131, 1982.
26. Mc COY BJ & COHEN K - Effects of various sera on growth kinetics and collagen synthesis by keloid and normal dermal fibroblasts. Plast Reconstr Surg, 67: 505-509, 1981.
27. MCGREGOR JC & LINDOP GBM - The behaviour of cialit-stored and freeze dried human fascia lata in rats. Brit J Plast Surg, 27: 155-164, 1974.
28. MKYATA T, RUBIN AL & STENZEL KH - Biochem Biophys Acta, 229: 672-80, 1971.
29. OLIVER RF, GRANT RA & KENT CM - Brit J Exp Pathol, 53: 540-49, 1972.
30. OLIVER RG et al. - Reconstruction of full-thickness loss skin wounds using skin collagen allografts. Brit J Plast Surg, 27: 87-90, 1977.
31. OLIVER RF, GRANT RA, HULME MJ & MUDIE A - Incorporation of stored cell-free dermal collagen allografts into skin wounds: a short term study. Brit J Plast Surg, 30: 88-95, 1977.
32. PFANNENSTIEL J - Zur diskussion über die paraffinein spritzung bei incontinentia urinae nach Gersuny. Zentralblatt f. Gynak, 2: 33, 1901.
33. POSTLETHWAIT RW - In repair and regeneration. (Ed. J.E. Dunphy e W. van Winkle), McGraw-Hill, New York, p. 366, 1969.
34. PRPIC I et al. - Use of xenograft corium for reconstruction of abdominal wall defects. Brit J Plast Surg, 27: 125-29, 1974.
35. PRUDDEN JF & WOLARKSKY E - The reversal by cartilage of the steroid-induced inhibition of wound healing. Surg Gyn Obstr, 125: 109-13, 1967.
36. REES TD - Les injections de silicone liquide aux États-Unis. Ann Chir Plast, XXV: 90-2, 1980.
37. SAMOHYL J, CHVAPIL M & MICHALEK V - Acta Chir Orthop Traum Czech, 36: 352-57, 1969.
38. SCHMITH GO et al. - The antigenicity of tropocollagen. Proc Nat Acad Sci, USA, 51: 493, 1964.
39. SEIFFERT KE - Preserved grafts in reconstructive surgery. Trans Fifty Internat Cong Plast Surg, Melbourne, pp. 766-775, 1971.
40. STENZEL KW et alii - Science, 164: 1282-83, 1969.
41. STENZEL KH, MIYATA T & RUBIN AL - Collagen as a biomaterial. Annual Review of Biophysics and Bioengineering, 3: 231, 1974.
42. WILLIAMS H, BRUCE & CREPEAU RJ - Free dermal fat flaps to the face. Ann Plast Surg, 3: 1, 1979.