

6.1 ANÁLISE HISTOLOGICA

Para o estudo microscópico das amostras de calvária, estas foram submetidas a dois métodos de coloração: hematoxilina-eosina e tricômico de Mallory. A escolha pelos métodos histoquímicos foi baseada em literatura, optando-se por aquelas que favorecem a visualização das estruturas celulares e de matriz óssea, bem como de componentes esperados durante a reposta osteogênica, como por exemplo, fibras colagenosas fibrosas evidenciadas pelo tricômico de Mallory em vermelho.

Antes porém, todas as amostras foram descalcificadas em ácido fórmico antes de incluir em parafina.

Após os protocolos histotécnicos de descalcificação, inclusão, diafanização, clarificação, coloração e montagem, as lâminas agora confeccionadas foram divididas em 2 grupos:

- Grupo 1 – Amostras com 6 semanas pós defeito em calvária.
- Grupo 2 – Amostras com 3 semanas após defeito em calvária.

CONTROLE	TESTE
C21	T21
C22	T22
C25	T25
C26	T26
C27	T27
C29	T29
C54	T54
C55	T55

Tabela 1 – Grupo 1 subdividido em 2 grupos: grupo Controle (C) e grupo Teste (T).

CONTROLE	TESTE
C11	T11
C56	T56
C57	T57
C59	T59
C60	T60
C61	T61
C63	T63
C64	T64

Tabela 2 – Grupo 2 subdividido em 2 grupos: grupo Controle (C) e grupo Teste (T).

Para a avaliação histológica foram adotados os seguintes critérios baseando-se nas respostas das seguintes avaliações:

- 1 - Presença de Infiltrado Inflamatório: infiltrado inflamatório, hemorragia, edema e formação de tecido de granulação.
- 2 – Fase de Reparação Óssea: angiogênese, presença de fibroblastos ativos, reação periosteal e endosteal.
- 3 – Fase de Remodelação Óssea:
 - 3.1 – Tecido Ósseo Compacto: fases de ativação, reabsorção osteoclástica, reversão osteoblástica e formação de osso lamelar (ósteons).
 - 3.2 – Tecido Ósseo Trabecular (Esponjoso): fases de ativação, reabsorção osteoclástica, reversão osteoblástica e formação de trabéculas.
- 4 – Presença de matriz osteóide e mineralização
- 5 – Formação de tecido hematopoiético

Quadro 1 – Critérios histológicos utilizados

6.1.1 - RESULTADOS

GRUPO 1: EUTANÁSIA COM 6 SEMANAS PÓS DEFEITO EM CALVÁRIA

Nas amostras do **Grupo Controle** deste grupo (C21, C22, C25, C26, C27, C29, C54 e C55) notaram-se predominantemente as seguintes características histológicas:

- a) Ausência de infiltrado celular inflamatório.
- b) Presença de periósteo moderadamente fibroso e endósteo discretamente reativo.
- c) Presença de fibras colágenas em alta quantidade.
- d) Presença de linha cimentante visível com moderada quantidade de matriz osteóide com focos de mineralização, seja em osso trabecular, seja em osso compacto.**
- e) Presença de tecido hematopoiético em formação com tecido adiposo predominante.**
- f) Presença de osteoblastos em monocamadas.
- g) Presença discreta de depósito de fibras colagenosas fibrosas.**
- h) Tecido Ósseo Compacto em fase de reversão osteoblástica (zonas de aberturas)
- i) Alguns Ósteons irregulares. Osso lamelar bem formado.**

j) Tecido Ósseo Trabecular em fase de reversão osteoblástica com trabéculas incompletas.

Nas amostras do **Grupo Teste** deste grupo (T21, T22, T25, T26, T27, T29, T54 e T55) notaram-se predominantemente as seguintes características histológicas:

a) Ausência de infiltrado celular inflamatório.

b) Presença de periósteo altamente fibroso e endósteo discretamente reativo.

c) Presença de fibras colágenas em alta quantidade.

d) Presença de linha cimentante visível com alta quantidade de matriz óssea e moderada quantidade de matriz osteóide seja em osso trabecular seja em osso compacto.

e) Presença de tecido hematopoiético formado com células hematopoiéticas presentes.

f) Presença de osteoblastos em monocamadas.

g) Presença de alto depósito de fibras colagenosas fibrosas

h) Tecido ósseo Compacto em fase de reversão osteoblástica (zonas de abertura)

i) Presença de Ósteons e Osso lamelar bem formado.

j) Tecido Ósseo Trabecular em fase de reversão osteoblástica com trabéculas completas.

As figuras _____, mostram essas diferenças.

GRUPO 2: Eutanásia com 3 semanas pós defeito em calvária

Nas amostras do Grupo Controle deste grupo (C11, C56, C57, C59, C60, C61, C63 e C64) notaram-se predominantemente as seguintes características histológicas:

a) Ausência de infiltrado celular inflamatório. Angiogênese, edema e hemorragia difusos.

- b) Presença de periósteo altamente fibroso.
- c) Presença de fibras colágenas em alta quantidade.
- d) Presença de fraca linha cimentante com alta quantidade de matriz osteóide não mineralizada, principalmente em osso trabecular.**
- e) Presença de tecido hematopoiético mal formado com tecido adiposo predominante.**
- f) Presença de alto depósito de fibras colagenosas fibrosas.**
- g) Tecido Ósseo Compacto focalmente ausente em algumas regiões.
- h) Alguns ósteons irregulares. Osso lamelar bem formado.**
- i) Tecido Ósseo Trabecular em formação.**

Nas amostras do Grupo Teste deste grupo (T11, T56, T57, T59, T60, T61, T64 e T64) notaram-se predominantemente as seguintes características histológicas:

- a) Ausência de infiltrado celular inflamatório. Angiogênese, edema e hemorragia difusos.
- b) Presença de periósteo altamente fibroso.
- c) Presença de fibras colágenas em alta quantidade.
- d) Presença de linha cimentante visível com moderada quantidade de matriz óssea e moderada quantidade de matriz osteóide seja em osso trabecular sem em osso compacto.**
- e) Presença de tecido hematopoiético em formação com tecido adiposo predominante.**
- f) Presença de alto depósito de fibras colagenosas fibrosas**
- g) Tecido ósseo Compacto em fase de reversão osteoblástica (zonas de abertura)
- h) Alguns ósteons e Osso lamelar bem formado.**
- i) Tecido ósseo Trabecular em fase de reversão osteoblástica com trabéculas completas.**

As figuras _____, mostram essas diferenças.

6.1.2 - DISCUSSÃO

Respondendo aos critérios utilizados (**QUADRO 1**) constatou-se que:

1 e 2 - Não houve alterações significativas entre os Grupos 1 e 2 seja Teste ou Controle em relação a reações inflamatórias, seja esta avaliada pelo infiltrado celular, edema, hemorragia ou angiogênese. Verificou-se apenas que no Grupo 2, tanto as amostras Teste ou Controle ainda apresentavam alguma evidência inflamatória, principalmente de origem hidro ou hemodinâmica. A reação periosteal foi marcante em praticamente todas as amostras, demonstrando assim, independentemente do Grupo (1, 2, Teste ou Controle) grande atividade periosteal durante osteogênese.

3 e 4 – Houve diferença estrutural no Grupo 2 na osteogênese do Osso Compacto. Este apresentou-se mais delgado e por vezes ausente em amostras do Grupo Controle do Grupo 2, enquanto que no mesmo grupo, as amostras Testes apresentaram uma formação mais sólida apresentando osso lamelar formado, mais mineralizado com aprisionamento de osteócitos. Em relação aos ósteons verificaram-se poucas alterações, sendo que os Grupos Testes, independente do grupo, apresentaram ósteons ligeiramente mais maduros (com lamelas concêntricas em maior quantidade), que poderia ser explicado por uma maior aceleração da fase reversão ou formação osteoblástica.

Em relação ao Osso Trabecular ou Esponjoso verificaram-se importantíssimas alterações. Estas podem ser divididas em 2 partes. Primeira: presença de maior mineralização da matriz osteóide Trabecular em Grupos Testes, seja do Grupo 1, seja do Grupo 2. Segundo: Maior espessura e maior desenvolvimento das trabéculas ósseas em Grupos Testes, seja do Grupo 1, seja do Grupo 2. Estes indícios podem confirmar que os Grupos Testes independente do tempo, aceleram a deposição de minerais em matriz osteóide, principalmente em osteogênese de osso trabecular.

5 – Também houve diferença na formação de espaços intertrabeculares e este fato pode estar diretamente relacionado com a formação das trabéculas, ou seja em grupos Testes, principalmente no Grupo 1, notou-se a formação de um tecido hematopoiético mais celularizado equanto que nos demais grupos predominava ainda tecido adiposo com algumas hemácias dispersas.

Histologicamente pode-se concluir que os animais do Grupo Teste, seja do grupo 1 como do Grupo 2 obtiveram as seguintes diferenças com os do Grupo Controle:

- Maior desenvolvimento e mineralização de estruturas ósseas trabeculares em osso trabecular (esponjoso). Maior quantidade de matriz óssea (mineralizada) trabecular.

- Discreto a moderado aumento na formação de tecido ósseo lamelar (maduro), seja em osso compacto seja em osso trabecular.

- Nenhuma diferença em padrões de resposta inflamatória.