

Capítulo 4

4.1 Resultados

4.1.1 Introdução ao capítulo de resultados

Visando à melhor compreensão sobre os resultados desse trabalho, assim como foi realizado para demonstrar os materiais e métodos, os resultados das diferentes etapas do trabalho serão apresentados conforme a ordem cronológica de seu desenvolvimento.

4.1.2 Resultados do estudo para a determinação da concentração de resveratrol na associação com biomateriais

A) Grupo experimental (**Gexp1**), que foi utilizado para preenchimento do leito cirúrgico com osso bovino liofilizado associado a 20% de seu peso com resveratrol.

As amostras coletadas desse grupo, tanto para 30 como 60 dias, demonstraram que houve um bom preenchimento do defeito ósseo. Entretanto, no período de 30 dias, pode-se verificar (figuras 11 a e b) e na tabela 6, a presença de partículas de osso liofilizado não reabsorvidas e uma atividade inflamatória aumentada, com a presença de grande quantidade de fibras colágenas no interior das amostras.

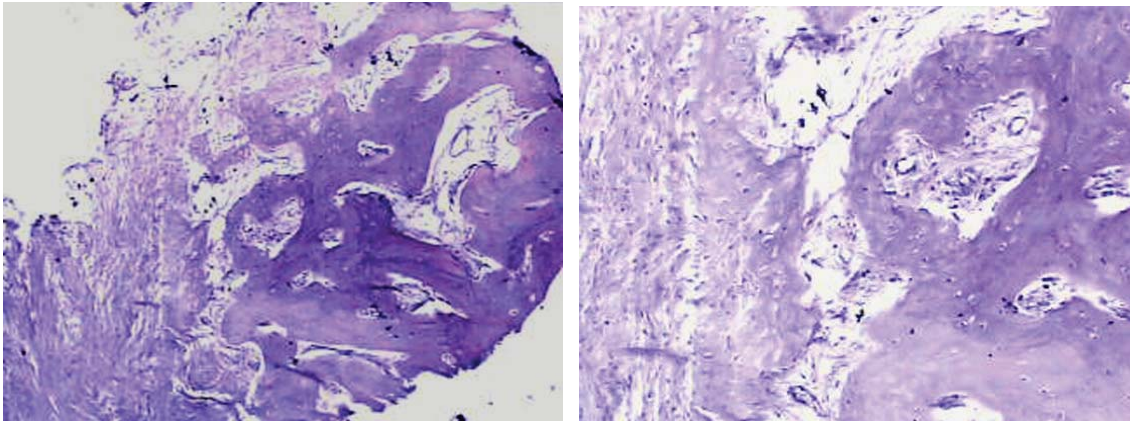
Tabela 6: Análise Semi-quantitativa do Gexp 1 (30 dias)

| ANIMAL | Inflamação | Fibras | Neoformação | Partículas | Células |
|--------|------------|--------|-------------|------------|---------|
| I | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| II | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| III | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 |

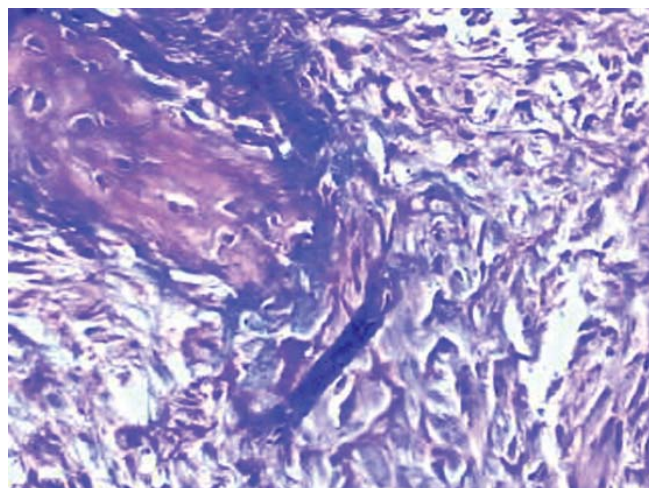
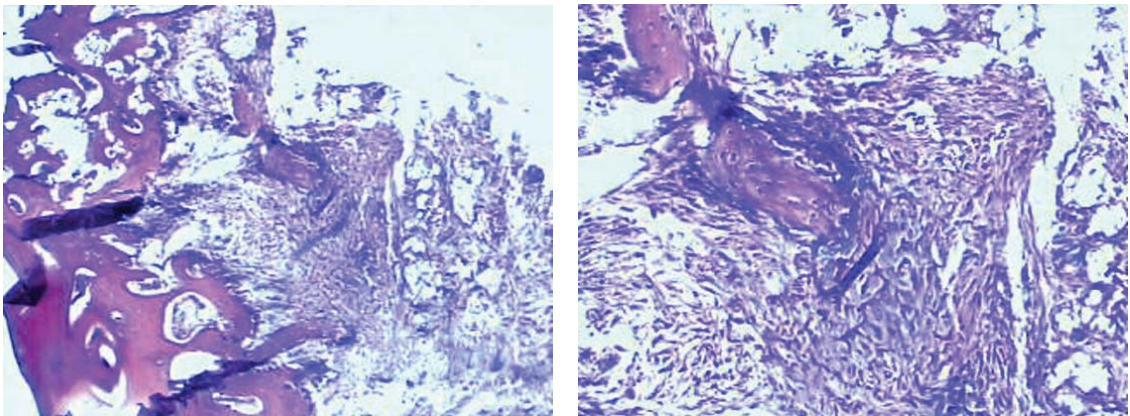
Nos animais com 60 dias, pode-se verificar ainda, a presença de algumas partículas de osso liofilizado não reabsorvido; porém, houve uma diminuição da quantidade de infiltrado inflamatório, com grande quantidade de fibras colágenas presentes nas amostras, demonstrando a pouca mineralização nessas áreas (figuras 12 a, b e c).

Tabela 7: Análise Semi-quantitativa do Gexp 1 (60 dias)

| ANIMAL | Inflamação | Fibras | Neoformação | Partículas | Células |
|---------------|-------------------|---------------|--------------------|-------------------|----------------|
| I | 1 | 1 | 2 | 0 | 2 |
| II | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 |
| III | 2 | 1 | 2 | 0 | 2 |



Figuras 11 a e b: Fotomicrografias do grupo Gexp 1 obtidas após 30 dias da cirurgia, coradas por HE, com aumentos de 4 e 10 vezes, respectivamente.



Figuras 12 a, b e c: Fotomicrografias do grupo Gexp 1 obtidas após 60 dias da cirurgia, coradas por HE, com aumentos de 4,10 e 40 vezes, respectivamente.

B) Grupo experimental (**Gexp2**), que foi utilizado para preenchimento do leito cirúrgico com osso bovino liofilizado associado a 40% de seu peso com resveratrol

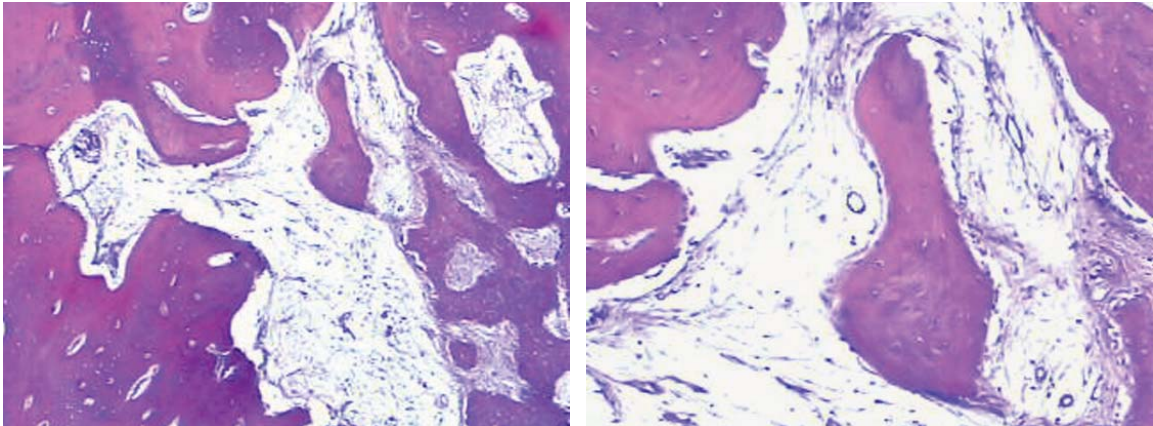
Muito semelhante aos resultados obtidos no grupo anterior para os dois períodos de tempo, esse grupo teve uma menor reação inflamatória, tanto em 30 dias, demonstrado na tabela 8 e figuras 13a e b, como em 60 dias, demonstrado na tabela 9 e figuras 14a, b e c, apresentando um pequeno aumento na reabsorção das partículas enxertadas.

Tabela 8: Análise Semi-quantitativa do Gexp 2 (30 dias)

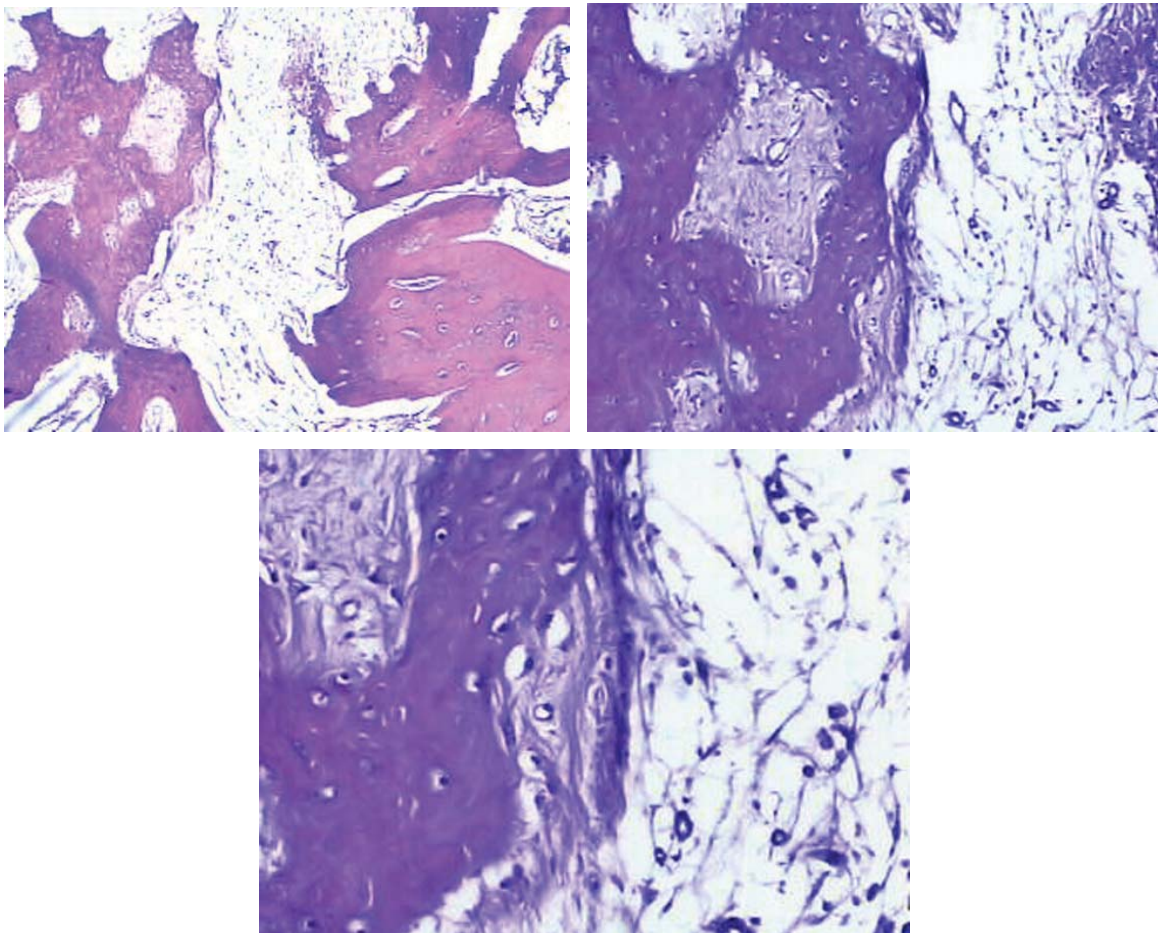
| ANIMAL | Inflamação | Fibras | Neoformação | Partículas | Células |
|--------|------------|--------|-------------|------------|---------|
| I | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| II | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| III | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |

Tabela 9: Análise Semi-quantitativa do Gexp 2 (60 dias)

| ANIMAL | Inflamação | Fibras | Neoformação | Partículas | Células |
|--------|------------|--------|-------------|------------|---------|
| I | 2 | 1 | 2 | 0 | 3 |
| II | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| III | 1 | 1 | 2 | 0 | 2 |



Figuras 13 a e b: Fotomicrografias do grupo Gexp 2 obtidas após 30 dias da cirurgia, coradas por HE, com aumentos de 4 e 10 vezes, respectivamente.



Figuras 14 a, b e c: Fotomicrografias do grupo Gexp 2 obtidas após 60 dias da cirurgia, coradas por HE, com aumentos de 4, 10 e 40 vezes, respectivamente.

C) Grupo experimental (**Gexp3**), que foi utilizado para preenchimento do leito cirúrgico com osso bovino liofilizado associado a 60% do seu peso com resveratrol.

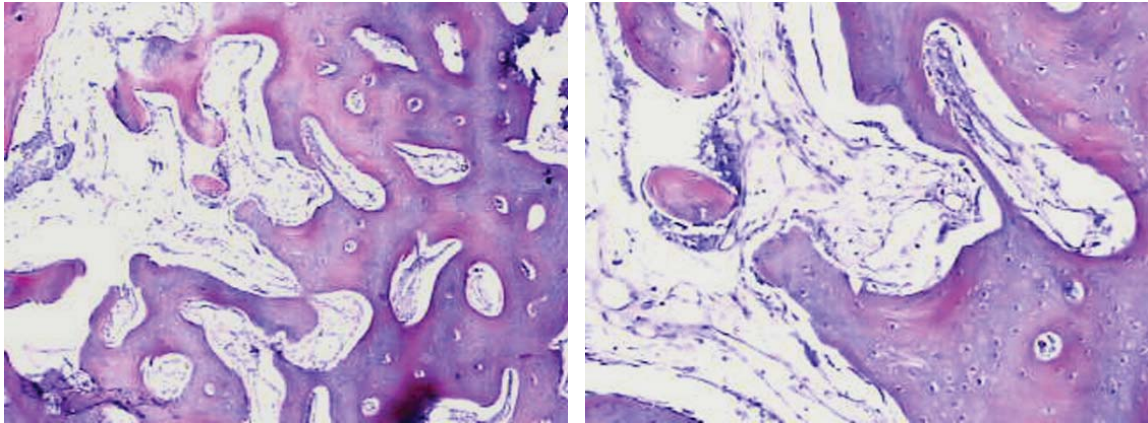
Nesse grupo, onde foram verificados os melhores resultados, houve uma pequena presença de infiltrado inflamatório, grande atividade celular e uma grande neoformação óssea. Ainda, as partículas do osso liofilizado colocadas no interior dos defeitos foram completamente reabsorvidas após 60 dias. Pode-se observar na figura 16c, com um maior aumento, que houve a formação de osteonas e uma adequada organização óssea.

Tabela 10: Análise Semi-quantitativa do Gexp 3 (30 dias)

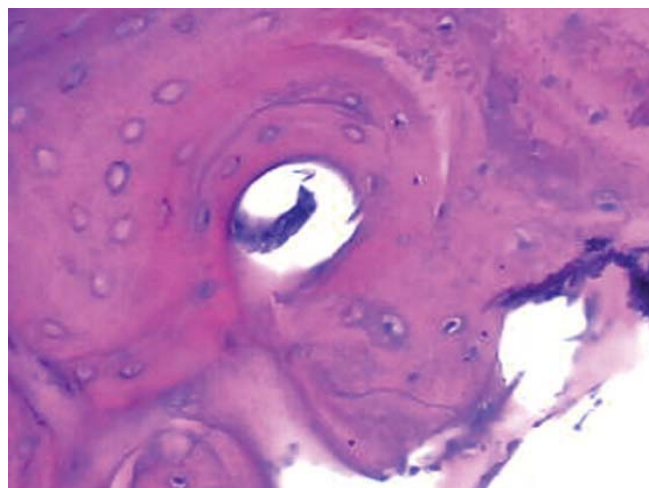
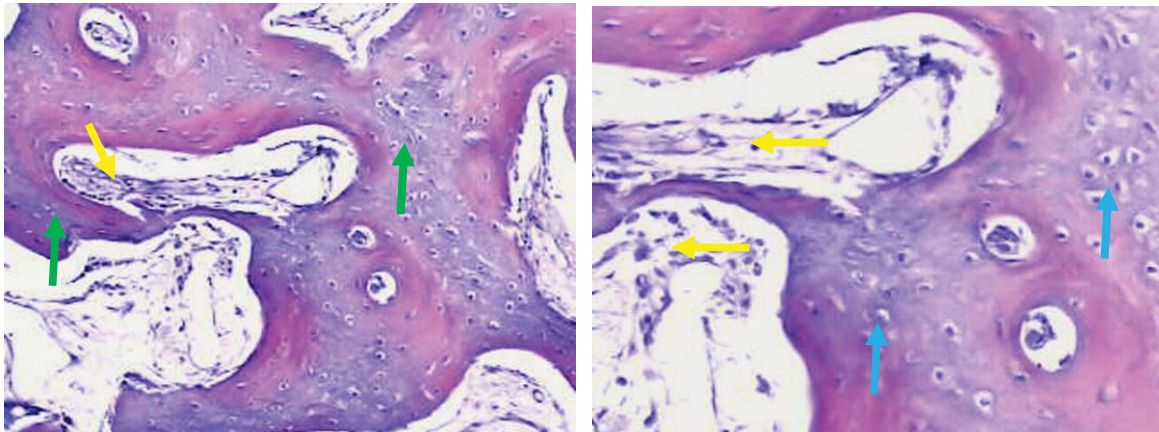
| ANIMAL | Inflamação | Fibras | Neoformação | Partículas | Células |
|--------|------------|--------|-------------|------------|---------|
| I | 2 | 1 | 2 | 1 | 3 |
| II | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 |
| III | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 |

Tabela 11: Análise Semi-quantitativa do Gexp 3 (60 dias)

| ANIMAL | Inflamação | Fibras | Neoformação | Partículas | Células |
|--------|------------|--------|-------------|------------|---------|
| I | 1 | 1 | 3 | 0 | 3 |
| II | 0 | 2 | 3 | 0 | 3 |
| III | 1 | 1 | 3 | 0 | 2 |



Figuras 15 a e b: Fotomicrografias do grupo Gexp 3 obtidas após 30 dias da cirurgia, coradas por HE, com aumentos de 4 e 10 vezes, respectivamente.

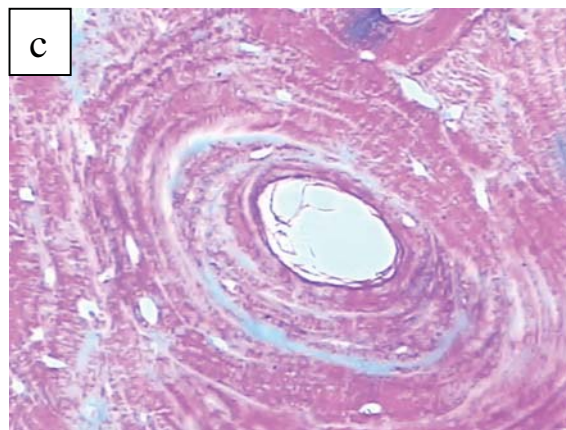
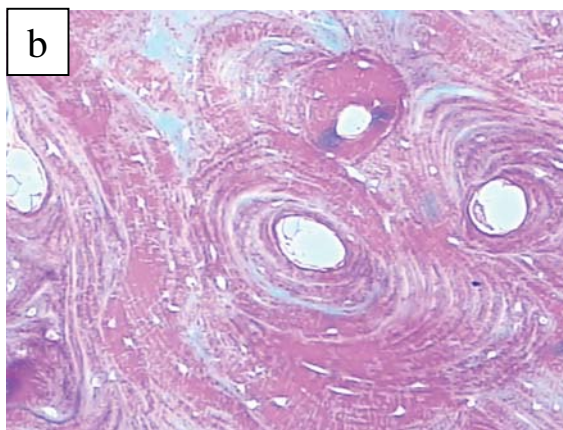
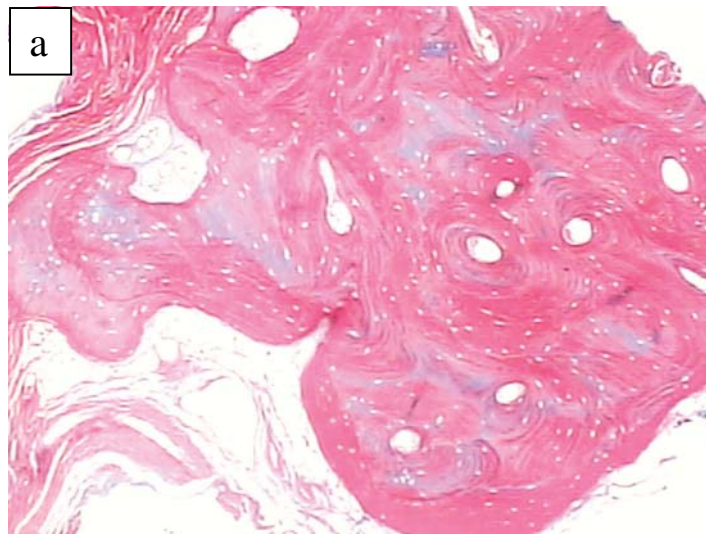


Figuras 16 a, b e c: Fotomicrografias do grupo Gexp 3 obtidas após 60 dias da cirurgia, coradas por HE, com aumentos de 4, 10 e 40 vezes, respectivamente.

Na área enxertada com osso bovino misturado com 60% de resveratrol em seu peso, Gexp3, em 30 dias, observou-se grandes áreas de atividade celular e formação intensa de fibras colágenas, característico de neoformação óssea (figuras 15 a e b). Os espaços onde a formação (calcificação) não estava completa apresentaram grande quantidade de vasos sanguíneos e fibras colágenas, com intensa presença de atividade celular.

Nesse grupo, após 60 dias (figuras 16 a e b), pode-se constatar intensa neoformação óssea, com boa densidade trabecular e grandes áreas de neoformação óssea (setas verdes). As trabéculas apresentaram células viáveis em seu interior (osteócitos - setas azuis), além de diversas linhas incrementais de crescimento. Nos espaços não calcificados da área enxertada, pode-se observar, também, em todos os casos, presença fibras colágenas com intensa atividade celular (setas amarelas). Outro fato sempre notado foi a presença de vasos sanguíneos, denotando intensa vascularidade na área em reparação (figuras 16 a, b e c). Nessas lâminas, também não foi detectada a presença de material de enxerto não reabsorvido.

Nesse grupo, devido aos bons resultados obtidos, algumas lâminas foram coradas com *Tricrômico de Masson* para a avaliação do tipo de fibras neoformadas e sua orientação, onde pode-se verificar que a distribuição em forma lamelar estava presente na maioria das amostras, com grande quantidade de fibras colágenas do tipo I (Figuras 17 a, b e c).



Figuras 17 a, b e c: Aspecto da distribuição e qualidade das fibras colágenas dentro do tecido ósseo neoformado com a coloração pelo *Tricromico de Masson* do Gexp 3, com aumento de 4, 10 e 40 vezes, respectivamente.

D) Grupo experimental (**Gexp 4**), que foi utilizado para preenchimento do leito cirúrgico com osso bovino liofilizado associado a 80% de seu peso com resveratrol.

Com os resultados desse grupo pode-se verificar que o aumento da quantidade de resveratrol em relação à quantidade de osso bovino liofilizado não trouxe melhora nos resultados finais. Pelo contrário, as observações demonstraram que houve uma menor formação óssea e aumento da quantidade

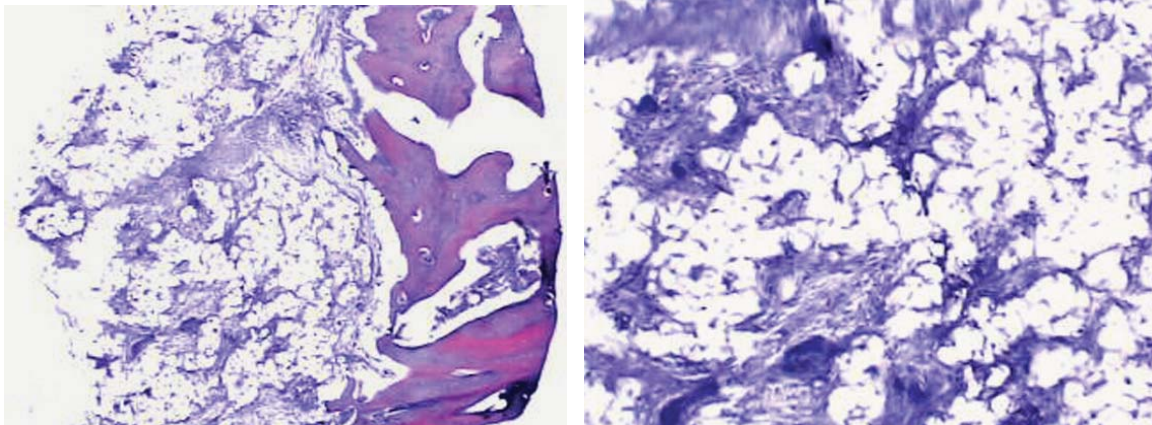
de fibras colágenas, o que provavelmente está relacionado ao fato da diminuição da estabilidade e manutenção do material dentro dos leitos cirúrgicos preparados. Com essa proporção do resveratrol, o qual é adicionado em partículas muito finas, o material preparado é facilmente eliminado pelo sangramento do defeito ósseo.

Tabela 12: Análise Semi-quantitativa do Gexp 4 (30 dias)

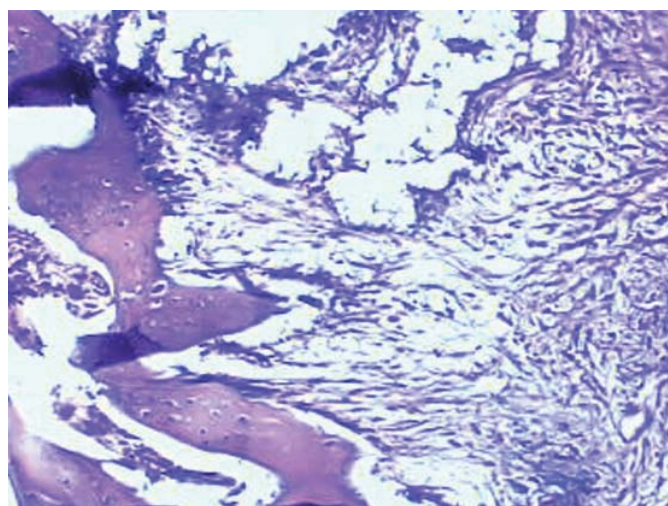
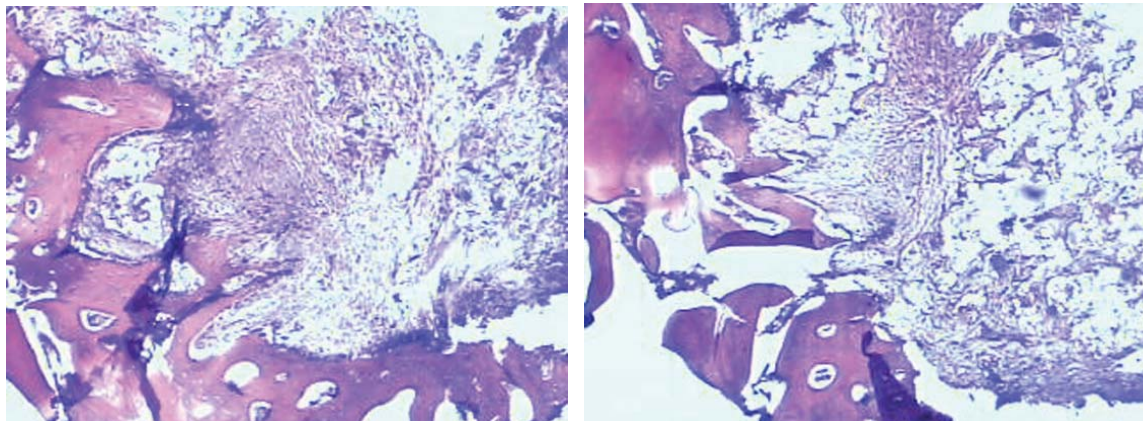
| ANIMAL | Inflamação | Fibras | Neoformação | Partículas | Células |
|--------|------------|--------|-------------|------------|---------|
| I | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| II | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| III | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 |

Tabela 13: Análise Semi-quantitativa do Gexp 4 (60 dias)

| ANIMAL | Inflamação | Fibras | Neoformação | Partículas | Células |
|--------|------------|--------|-------------|------------|---------|
| I | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 |
| II | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| III | 2 | 3 | 2 | 0 | 2 |



Figuras 18 a e b: Fotomicrografias do grupo Gexp 4 obtidas após 30 dias da cirurgia, coradas por HE, com aumentos de 4 e 10 vezes, respectivamente.



Figuras 19 a, b e c: Fotomicrografias do grupo Gexp 4 obtidas após 60 dias da cirurgia, coradas por HE, com aumentos de 4, 10 e 40 vezes, respectivamente.

4.1.3 Resultados do estudo dos efeitos do resveratrol na regulação do NF-kB

A) Grupos de controle do método utilizado

Devido a pouca experiência com os procedimentos com essa técnica, os grupos foram propostos para avaliar e dirimir as possíveis dúvidas existentes quanto à efetividade da técnica, do anticorpo utilizado e da especificidade estabelecida entre o anticorpo e o tecido ósseo mineralizado.

B) Grupo controle sem Cirurgia

Nas amostras desse grupo não foi possível observar uma imunorreatividade positiva para o NF-kB. A avaliação, conforme descrita anteriormente, foi a partir de um ponto na região proximal nas regiões periosteais, médias e endostais; e as posições zero, +1, +4, +8 e joelho.

Apenas em algumas lâminas avaliadas, foi observada uma imunorreatividade positiva para esta endonuclease, a NF-kB, porém bem dispersa, sem localização definida, o que indica a existência de uma atividade basal desta endonuclease, talvez relacionada ao contínuo processo de remodelação do tecido ósseo, conforme a figura 20 abaixo.

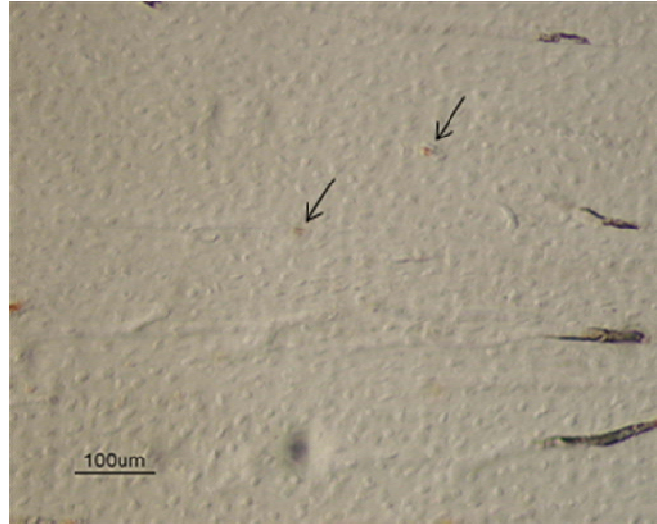


Figura 20: Imunoreatividade para o NF-kB no grupo controle não operado. A seta indica marcações positivas na região média posição 4. Neste grupo as marcações se mostraram esparsas sem posições e regiões definidas, indicando uma ativação fisiológica desta endonuclease para este tecido.

C) Grupo Controle do processo

Esse controle foi realizado nas próprias lâminas já montadas nos diversos períodos e tratamentos realizados neste trabalho, sendo que o processamento das mesmas seguiu a mesma metodologia descrita anteriormente no capítulo 3, exceto o fato de que as mesmas não foram incubadas com o anticorpo primário. Os procedimentos de incubação dos anticorpos secundários e terciários foram realizados, bem como a revelação da reação com “DAB”. Esse cuidado na preparação das lâminas teve a finalidade de observar alguma reação inespecífica com os anticorpos secundários a mistura e terciária. Os resultados desse grupo indicaram a não interferência desses anticorpos na reação, não sendo observada imunoreatividade positiva neste grupo, conforme demonstra figura 21 abaixo.

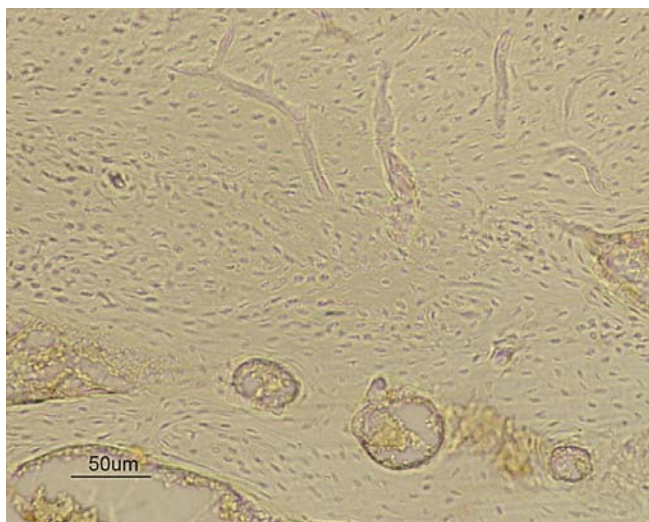


Figura 21: Imagem acima representa grupo controle do processo. Neste grupo não foi observado imunoreatividade positiva para o NF-kB , indicando que os anticorpos 2° e 3° e o cromógeno não interferiram com o processo.

D) Grupo controle Positivo

O processo de imunohistoquímica foi realizado em cortes de carcinoma de próstata humana, conforme sugere o fabricante do anticorpo (Zymed®). Pela revisão da literatura, sabe-se que esta endonuclease está ligada diretamente aos processos carcinogênicos, interferindo diretamente na resistência a agentes quimioterápicos (RAVI e BEDI 2004). Assim, as amostras foram embutidas em parafina e em seguida foram cortas em micrômetro convencional com a espessura aproximada de 5µm. Esse grupo foi proposto para se certificar da efetividade do anticorpo. Os resultados indicaram uma imunorreatividade positiva para o NF-kB nas células da próstata (figura 22a). Em maior aumento, foi possível verificar esta predominância citoplasmática nas células do epitélio dos ductos, conforme é possível avaliar na figura 22b abaixo.

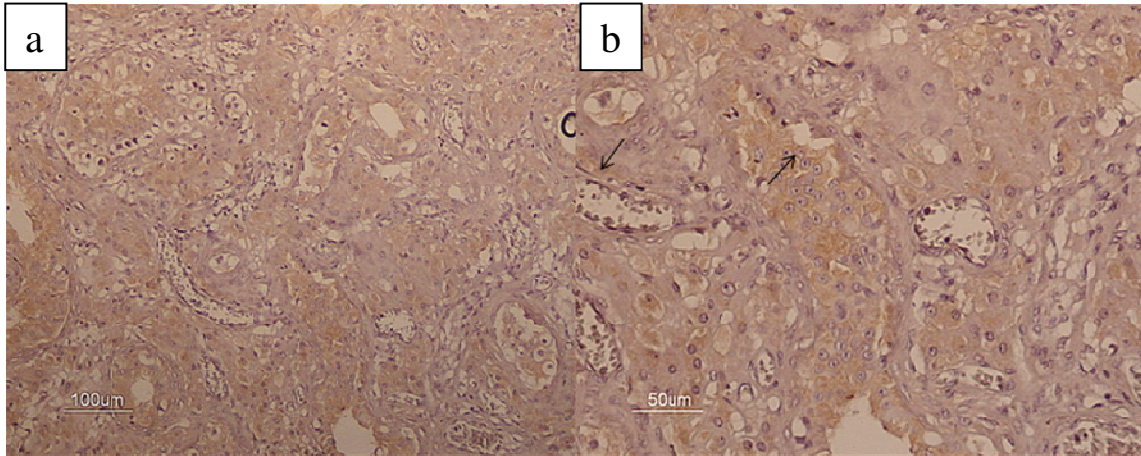


Figura 22 a e b: Imagem relacionada ao grupo controle positivo realizado em câncer de próstata na imagem 47a em maior aumento é possível notar uma intensa imunoreatividade do tecido em relação ao NF-kB, em 47b é possível notar sua localização no citoplasma celular com mais evidência próximo aos condutos (seta).

E) Grupo determinação da curva de ativação do NF-kB

Esse grupo teve como objetivo principal determinar o pico de ativação do NF-kB em cortical óssea dos animais. As observações neste grupo indicaram uma ativação do NF-kB por toda a cortical óssea, não se limitando apenas à região lesada, incluindo a articulação do joelho. Os resultados são apresentados de maneira descritiva da semi quantificação, sendo analisados e expressos na forma de gráficos (gráficos 1, 2 e 3).

Gráfico 1

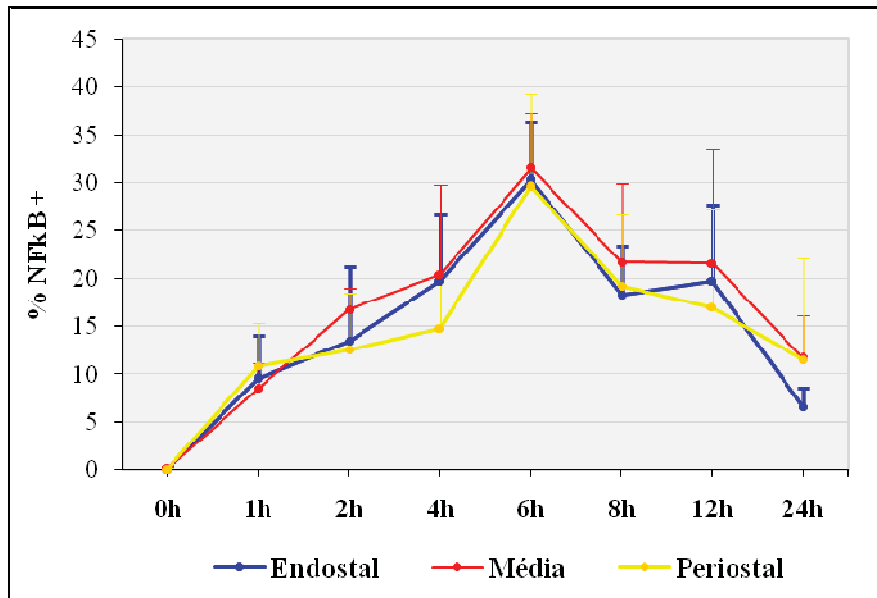


Gráfico 1: Os resultados da quantificação avaliados da média entre todas posições das 3 regiões, Endostal, Média e Periostal, estão expressos no gráfico acima. Os resultados indicam uma maior imunorreatividade positiva para o NF-kB em 6h.

Gráfico 2

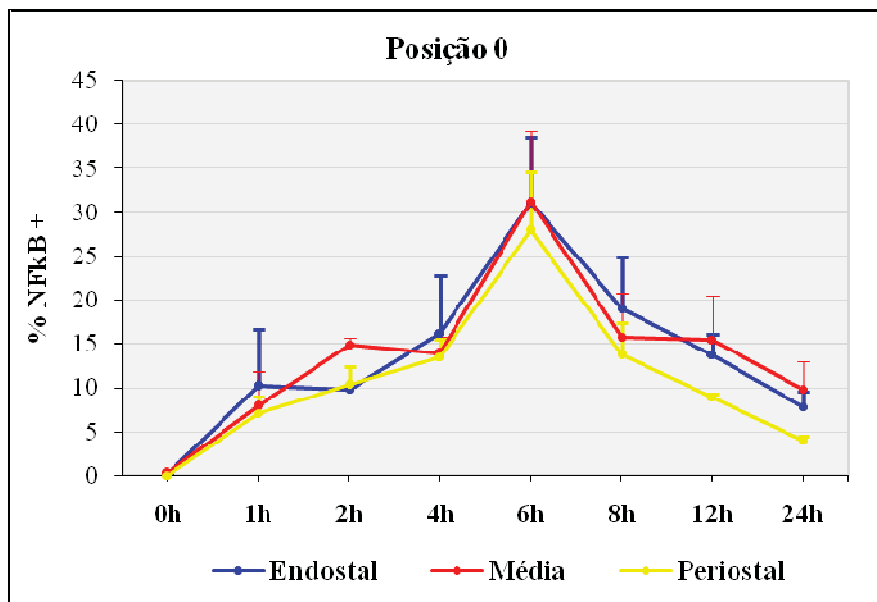


Gráfico 2: Os resultados da quantificação avaliados nas três regiões para a Posição 0, estão expressos no gráfico acima. Os resultados indicam uma maior imunorreatividade positiva para o NF-kB em 6h.

Gráfico 3

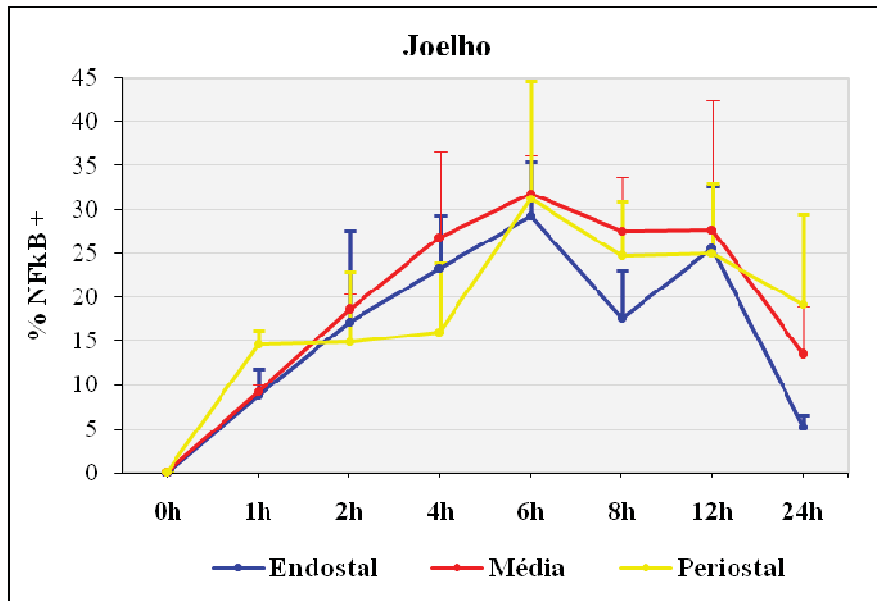


Gráfico 3: Os resultados da quantificação avaliados nas três regiões para a Posição Joelho, estão expressos no gráfico acima. Os resultados indicam uma maior imunorreatividade positiva para o NF-kB em 6h.

Com os resultados desses três gráficos, foi determinado o pico da curva de ativação do NF-kB na cortical óssea dos animais, sendo esse estabelecido como 6 horas. Na região Endostal foi encontrado um maior número de células imunorreativas para o NF-kB. Assim, estatisticamente, houve uma diferença significativa na posição 6h, o que indica o pico de ativação do NF-kB em 6 horas. Foi observado que a endonuclease NF-kB está concentrada na região periférica dos osteócitos e não próxima ao núcleo. A partir de 6 horas, observou-se uma migração desta endonuclease em direção ao núcleo (figura 23), e na (figura 24), sendo possível notar a imunorreatividade na região periostal.

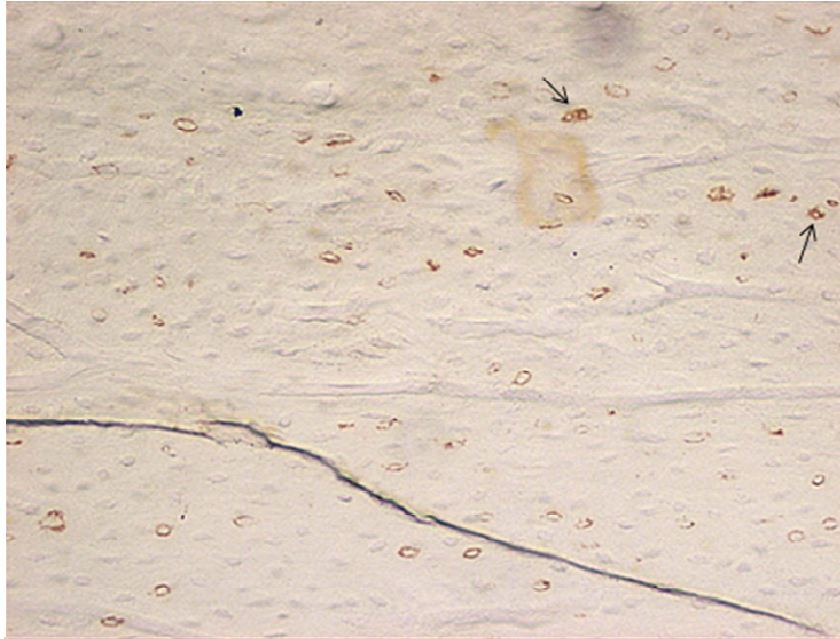


Figura 23: Imagem representa grupo curva de ativação 6h, nota-se que a imunoreatividade se aproxima do núcleo (seta). Aumento de 40 vezes.

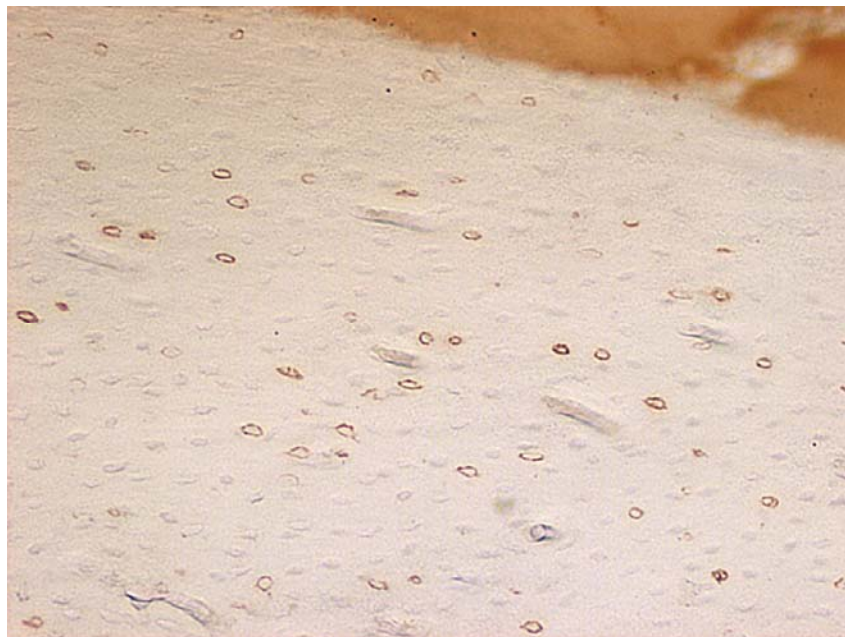


Figura 24: Imagem onde é possível notar a imunoreatividade na região periosteal. Aumento de 40 vezes.

Na figura 25, contra-corada com hematoxilina de Mayer, e em maior aumento, pode-se notar a localização do núcleo dos osteócitos e as marcações positivas pelo método imunohistoquímico.

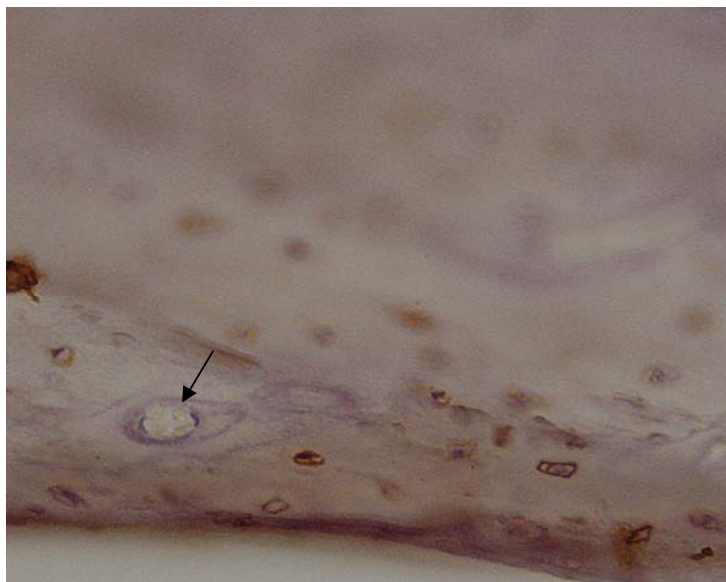


Figura 25: Lâmina contra-corada com hematoxilina de Mayer, notamos a localização do núcleo dos osteócitos (seta). Aumento de 100 vezes.

A figura 26 indica a possível organização da ativação do NF-kB que foi observada durante as contagens. As células marcadas seguiram um padrão bem estabelecido, com a forma aproximada de uma helicóide. Estas helicóides parecem se relacionar, mantendo uma continuidade por toda a cortical óssea, como é verificado na figura 26.

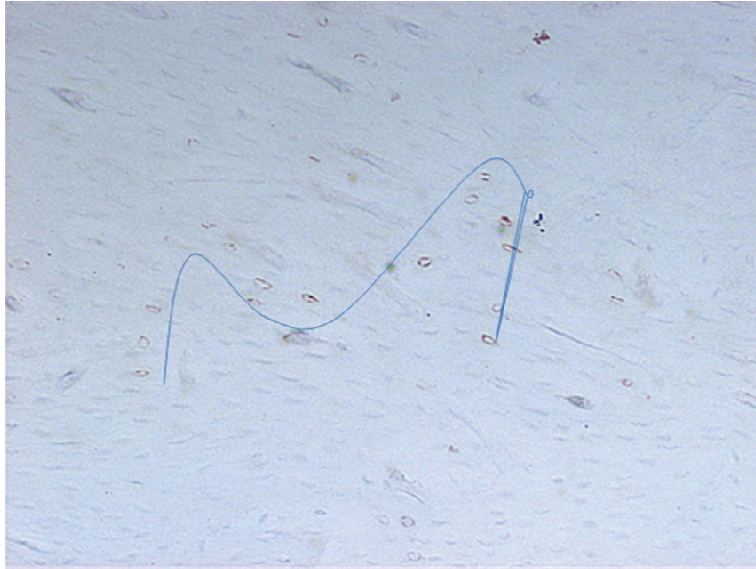


Figura 26: Indica uma possível organização da ativação do NF-kB, onde as células marcadas seguem um padrão bem estabelecido com uma forma aproximada de uma helicóide. Aumento de 40 vezes.

Na figura 27, em menor aumento, é possível notar que a imunorreatividade positiva para o NF-kB tem uma semelhança com um triângulo com base voltada para região Periostal.

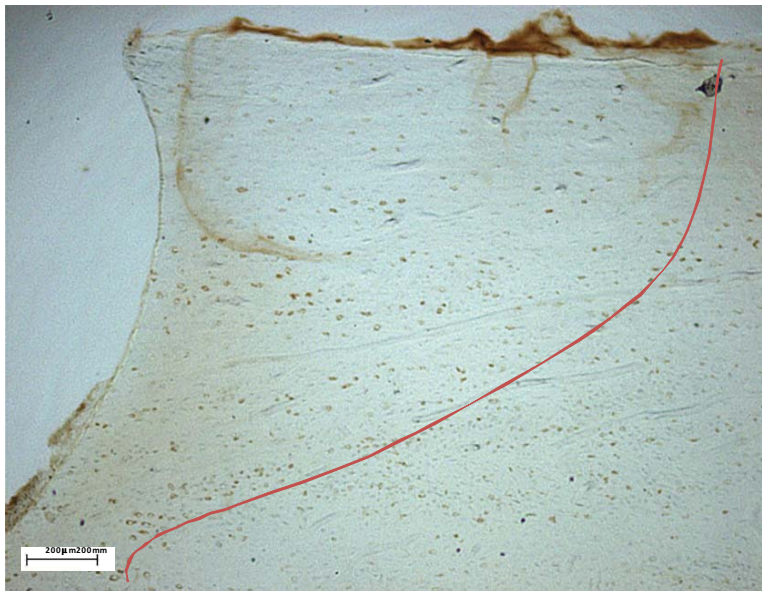


Figura 27: Imagem formada tem semelhança com um triângulo com a base voltada para a região Periostal. Aumento de 10 vezes.

F) Grupos experimentais

Grupo Controle 1 (**Gcon 1**)

Como o pico da curva de ativação do NF-kB em cortical óssea ficou estabelecido em 6 horas, esse tempo foi utilizado como referência para a comparação entre os grupos propostos. Nesse grupo, não houve diferença nos valores encontrados nas diferentes posições e regiões estudadas, conforme demonstrado na tabela 14 e no gráfico 4. As imagens serão demonstradas e descritas detalhadamente com as observações encontradas nesse grupo.

Tabela 14: Tabela das marcações para NF-kB do grupo controle 1.

| POSIÇÃO | Endostal | Médio | Periostal | Média | DV |
|----------------|-----------------|--------------|------------------|--------------|-----------|
| 0 | 30,20 | 31,50 | 29,50 | 30,40 | 1,00 |
| 1 | 32,30 | 34,40 | 38,80 | 35,20 | 3,20 |
| 4 | 31,80 | 33,50 | 38,30 | 34,50 | 3,30 |
| 8 | 30,10 | 41,60 | 35,70 | 35,80 | 5,70 |
| Joelho | 29,20 | 31,80 | 31,20 | 30,70 | 1,30 |

Gráfico 4

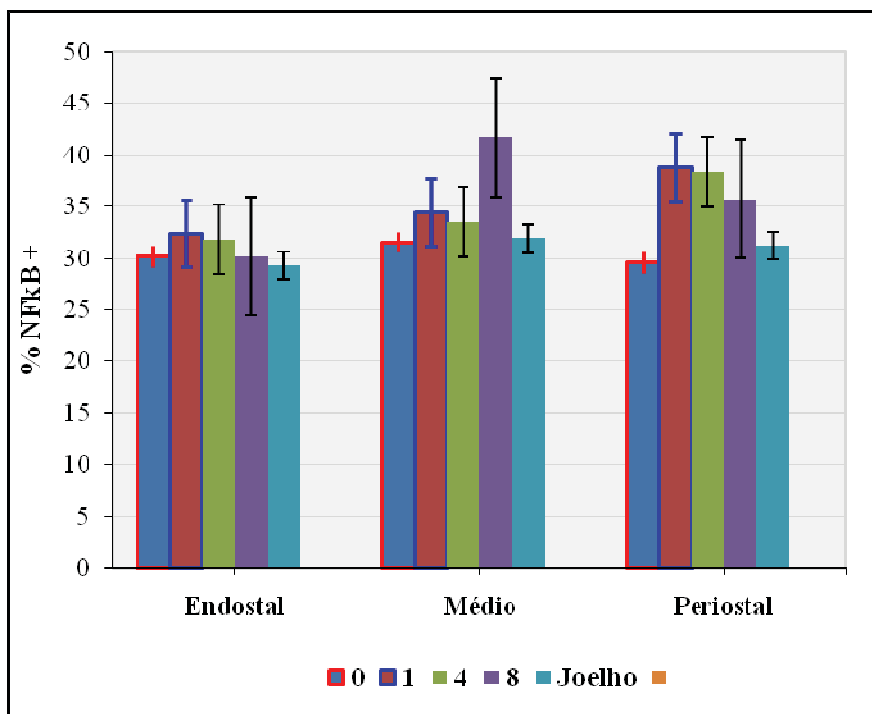
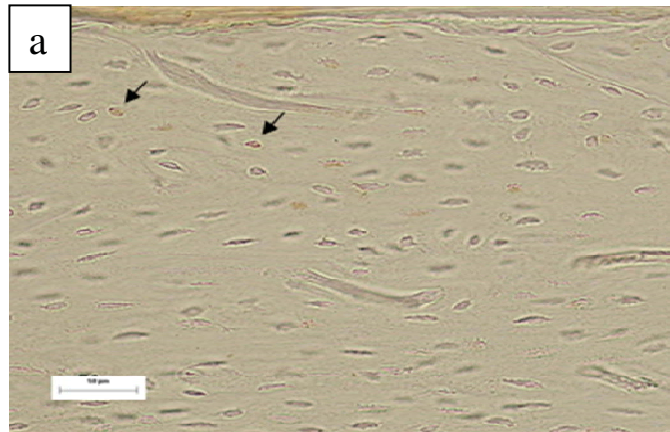


Gráfico 4: Indica os resultados encontrados nas diversas posições e regiões estudadas do grupo Controle 1. Nesse grupo, na comparação de regiões e posições não houve diferenças estatisticamente significativas nas posições.



Figuras 28 a, b e c: Imagens do grupo controle 1 em (a) região periosteal, em (b) região média, em (c) região endostal. Nota-se uma semelhança das imunomarcações em todas as regiões. Aumento de 40 vezes.

Grupo Controle 2 (Gcon 2)

Nesse grupo, o objetivo foi avaliar a existência ou não da efetividade da refrigeração por solução fisiológica sobre a imunorreatividade positiva do NF-kB, em cortical óssea. É oportuno lembrar que este foi o único grupo onde houve uma irrigação abundante com solução fisiológica. Esses resultados indicaram uma redução significativa da imunorreatividade positiva para o NF-kB em todas as posições, exceto na posição joelho. Os resultados estatísticos apresentados indicam as diferenças entre as regiões Periostal, Média e Endostal, no gráfico 5.

Os resultados da imunolocalização positiva para o NF-kB ficou indicado nas figuras 29a, b e c. Nessas três imagens sequenciais, foi possível notar claramente a influência da irrigação na imunorreatividade positiva para o NF-kB, o que pode levar a conclusão de que realmente ocorre uma diminuição do dano com uma adequada refrigeração óssea durante a fresagem.

Tabela 15: Tabela das marcações celulares verificadas para NF-kB do grupo irrigado.

| POSIÇÃO | Endostal | Médio | Periostal | Média | DV |
|---------|----------|-------|-----------|-------|-------|
| 0 | 28,20 | 24,50 | 19,40 | 24,00 | 4,40 |
| 1 | 22,30 | 25,80 | 19,00 | 22,30 | 3,40 |
| 4 | 22,00 | 22,50 | 24,80 | 23,10 | 1,40 |
| 8 | 18,40 | 18,80 | 21,30 | 19,50 | 1,60 |
| Joelho | 22,20 | 32,80 | 42,60 | 32,60 | 10,20 |

Gráfico 5

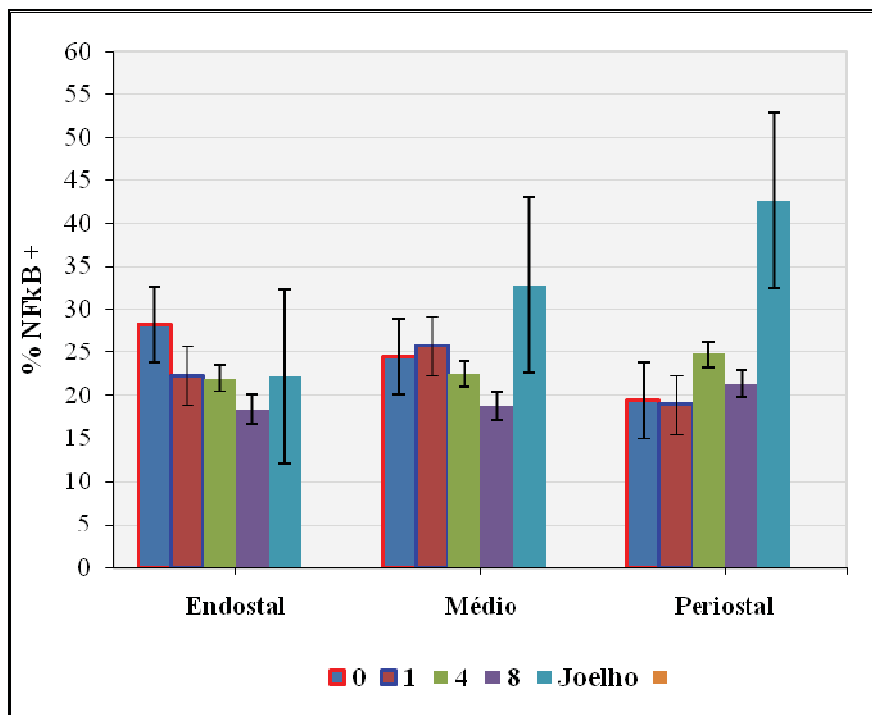
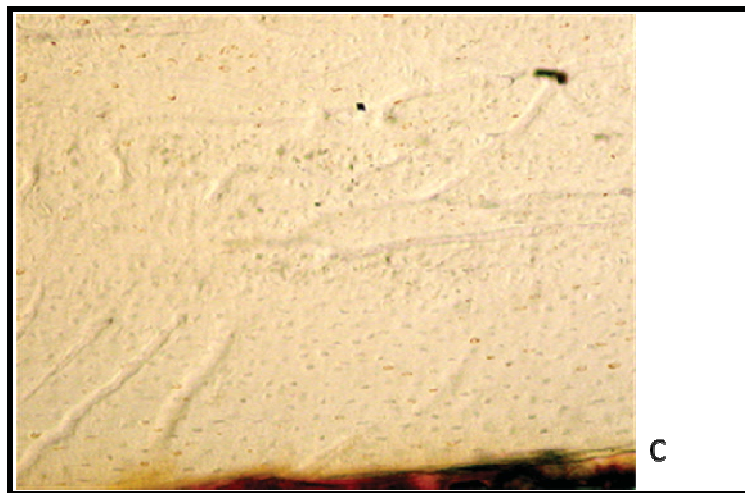


Gráfico 5: Indica os resultados encontrados nas diversas posições e regiões estudadas do grupo controle 2. . Nesse grupo, na comparação de regiões e posições houve diferenças estatisticamente significativas em todas posições, exceto na posição Joelho (* $p < 0,05$).



Figuras 29 a, b e c: Imagens do grupo irrigado em (a) região periosteal, em (b) região média, em (c) região endosteal. Nota-se uma redução das imunomarcações na região periosteal comparativamente as imagens (b e c). Aumento de 40 vezes.

Grupo resveratrol 3 (**Gres 3**)

O objetivo principal foi avaliar se o resveratrol poderia apresentar alguma ação biológica que explicasse a expressiva neoformação óssea observada em estudos preliminares, pois praticamente todos os artigos apresentados até o momento descrevem a atuação do resveratrol sobre o NF-kB, porém por via sistêmica. Quando em aplicação local não foi encontrado nenhum relato ou observações na literatura.

Os resultados estatísticos indicaram um resultado estatístico significativo para as regiões 0 e 1, próximas ao local lesado e, nas três posições estudadas. Ainda, nota-se uma redução da imunorreatividade positiva em todas as posições e regiões estudadas, quando comparados os resultados com os demais grupos, o que indica uma efetiva participação do Resveratrol na redução da ativação do NF-kB em cortical óssea dos coelhos. Isto pode ser melhor observado no gráfico 6 e tabela 16 abaixo.

Tabela 16: Tabela das marcações para NF-kB do grupo resveratrol 3.

| POSIÇÃO | Endostal | Médio | Periostal | Média | DV |
|---------|----------|-------|-----------|-------|------|
| 0 | 17,70 | 18,10 | 18,50 | 18,10 | 0,40 |
| 1 | 22,30 | 24,40 | 28,80 | 25,20 | 3,20 |
| 4 | 31,80 | 33,50 | 28,30 | 31,20 | 2,60 |
| 8 | 30,10 | 43,60 | 25,70 | 33,10 | 9,30 |
| Joelho | 32,20 | 32,10 | 36,00 | 33,40 | 2,20 |

Gráfico 6

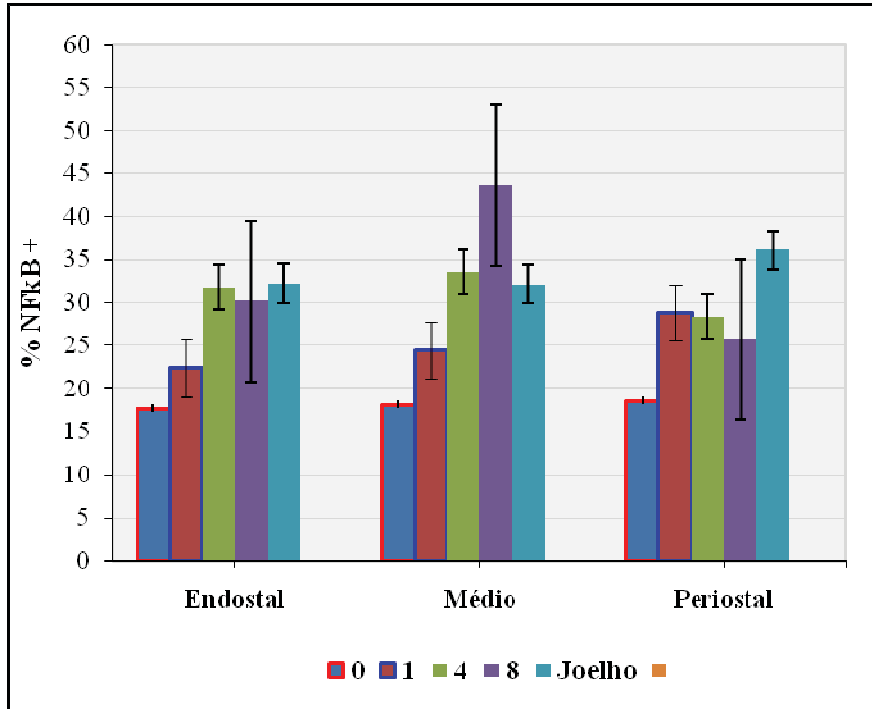
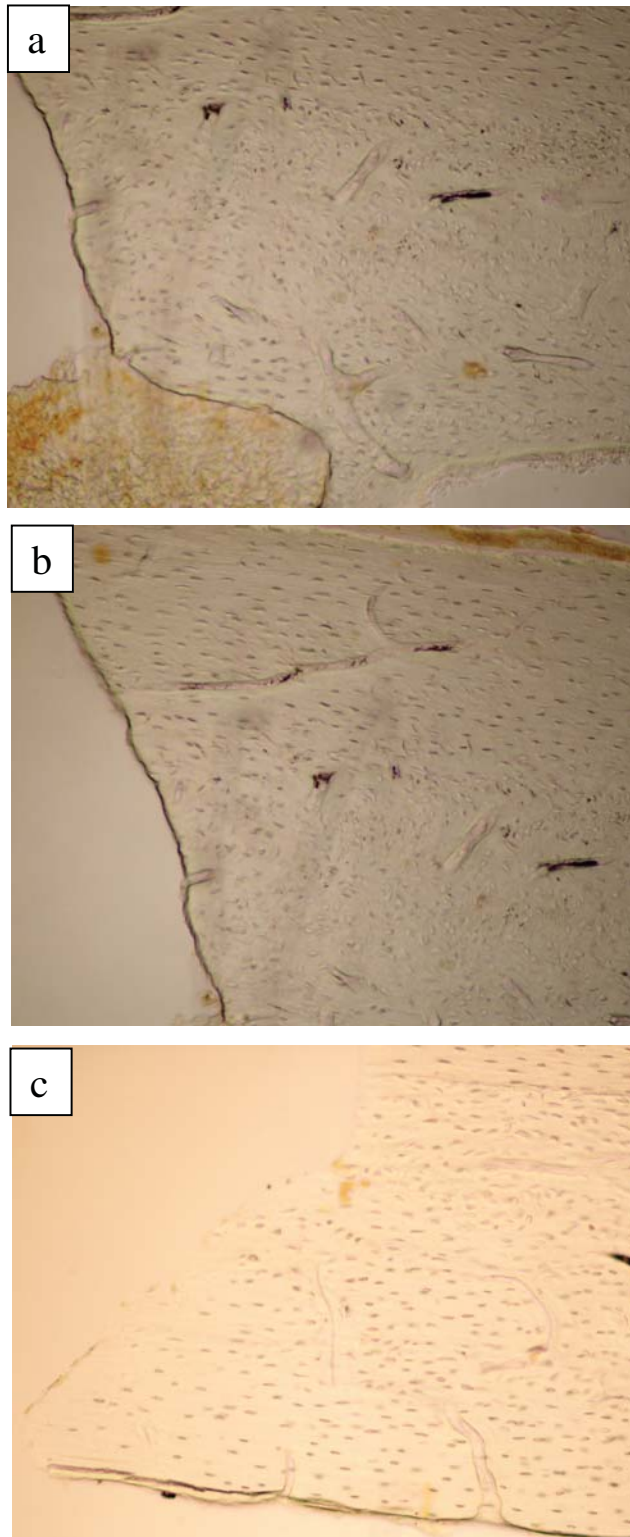


Gráfico 6: Indica os resultados encontrados nas diversas posições e regiões estudadas do grupo resveratrol. Nesse grupo, na comparação de regiões e posições houve diferenças estatisticamente significativas nas posições 0 e 1 (* $p < 0,05$).

A imagem (30 a, b e c), representa a imunorreatividade positiva para o NF- κ B na posição 0 e região do joelho, no grupo resveratrol.



Figuras 30 a, b e c: Imagens do grupo resveratrol em (a) região periosteal, em (b) região média, em (c) região endostal. Nota-se uma redução significativa das imunomarcações nessas regiões na posição 0 quando comparadas com as demais regiões desse grupo. Aumento de 40 vezes.

Resultados estatísticos dos grupos experimentais

Inicialmente foram feitos testes paramétricos dentro de cada grupo, indicando que os valores não diferem nas várias posições e regiões estudadas para o valor de $p < 0,05$.

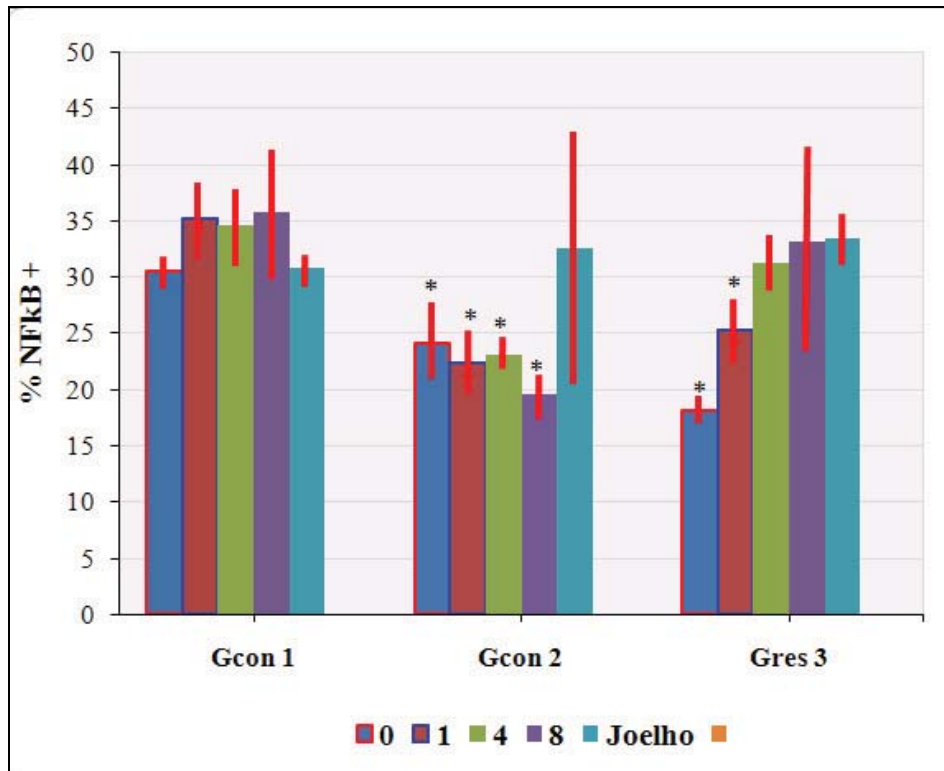
A seguir foram feitos os testes de significância com a finalidade de comparar os grupos 2 e 3 com o grupo controle 1. De acordo com o teste não-paramétrico utilizado, encontraram-se diferenças significativas para o valor de $p < 0,05$. Portanto, pelos dois testes, paramétrico e não-paramétrico, observou-se que a metodologia aplicada nos grupos Gcon 2 e Gres 3 conduzem a valores da NF-kB significativamente menores que do Gcon 1.

Tabela 17: Tabela das marcações para NF-kB entre os grupos experimentais.

| POSIÇÃO | Gcon 1 | Gcon 2 | Gres 3 |
|---------|---------------|----------------|----------------|
| 0 | 30,50 ± 3% | 24,00 ± 18,3%* | 18,20 ± 2,2%* |
| 1 | 35,20 ± 9% | 22,40 ± 15,2%* | 25,20 ± 12,7%* |
| 4 | 34,60 ± 9,5% | 23,10 ± 6%* | 31,20 ± 8,3% |
| 8 | 35,80 ± 15,9% | 19,50 ± 8,2%* | 33,20 ± 28,1% |
| Joelho | 30,80 ± 4,2% | 32,60 ± 31,2% | 33,50 ± 6,5% |

* $p < 0,05$, quando comparado os efeitos entre os grupos Gcon 1 e Gcon 2 e a comparação dos grupos Gcon 1 e Gres 3, para os testes paramétricos e não-paramétricos. Os números representam as médias das posições em cada grupo, referente as células marcadas.

Gráfico 7

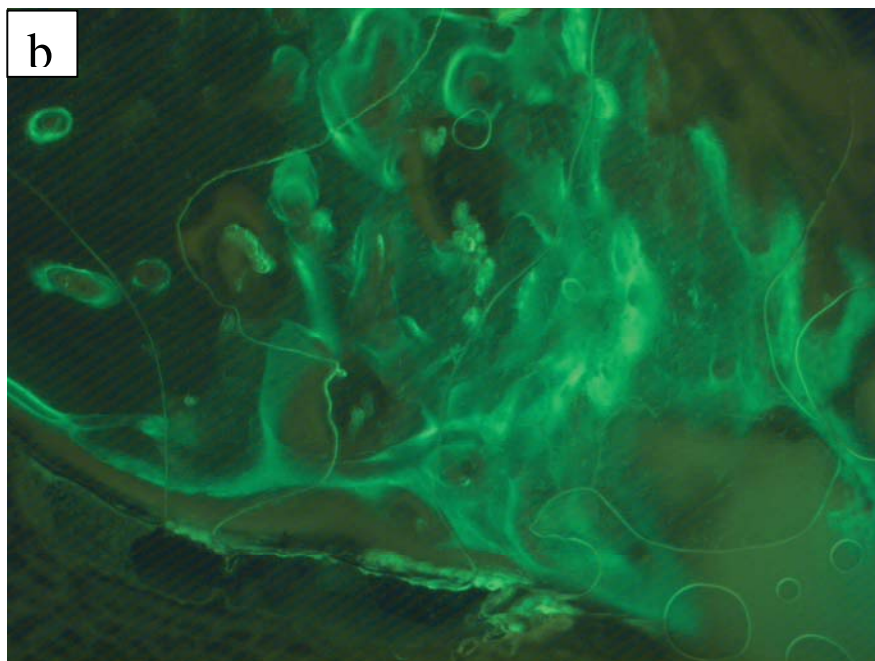
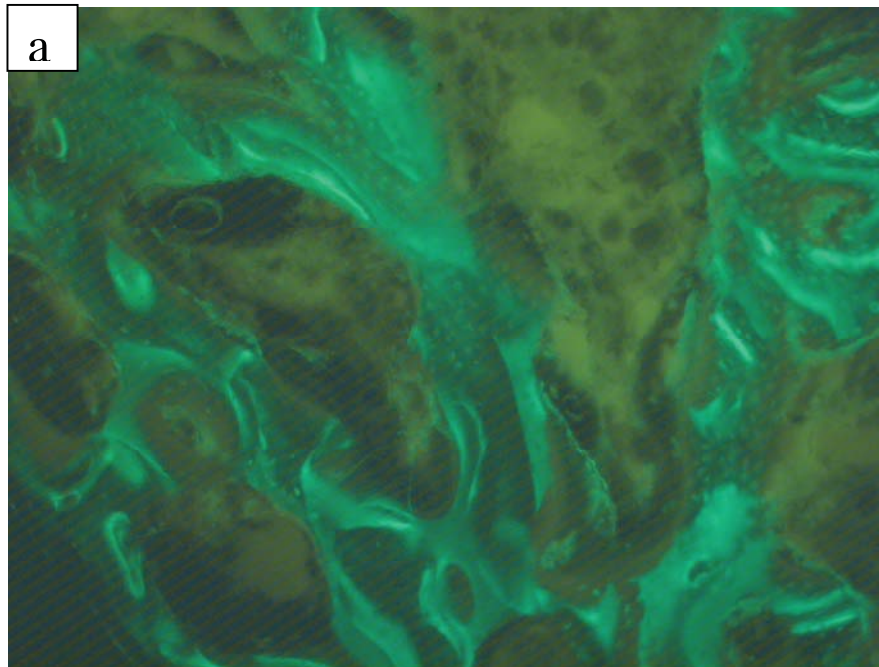


Indica os resultados encontrados nas diversas regiões estudadas fazendo a comparação entre os grupos Gcon 1 e Gcon 2; Gcon 1 e Gres 3, para a análise estatística (* $p < 0,05$).

4.1.4 Resultados do estudo para a avaliação em diferentes tempos da utilização de resveratrol para a neoformação óssea através da injeção de marcadores de fluorescência

A) Grupo Controle 1(**GC1**). Nesse grupo o leito cirúrgico foi somente preparado, não sendo utilizado nenhum material para seu preenchimento, somente o coágulo. Como podemos observar nas fotomicrografias 31 a e b a neoformação óssea nesse grupo teve uma grande atividade durante o período de 21 até 35 dias, pois temos a presença intensa do marcador Calceína, de coloração verde. Pode-se

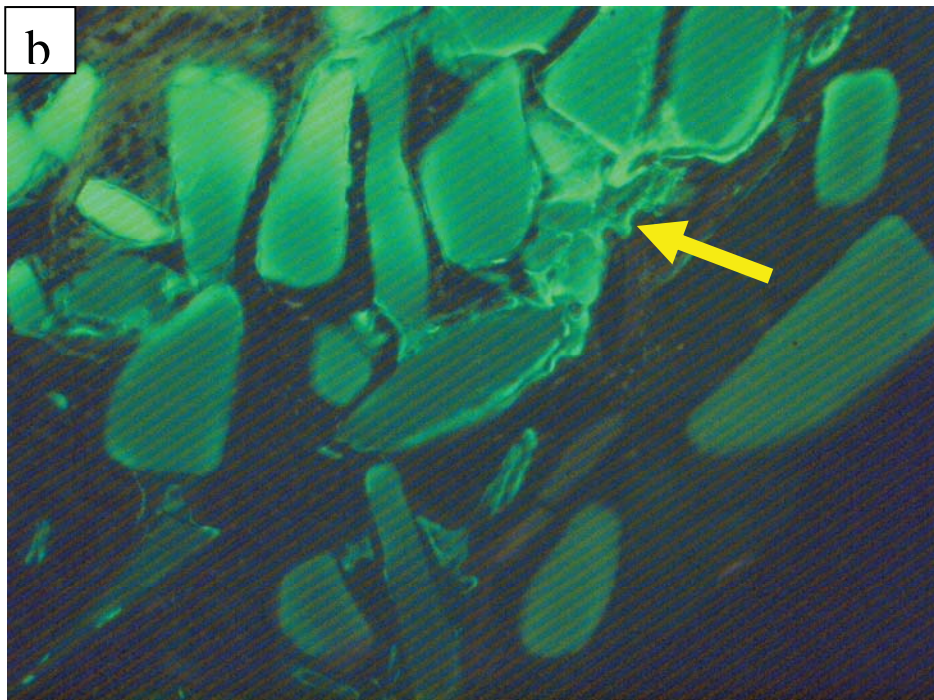
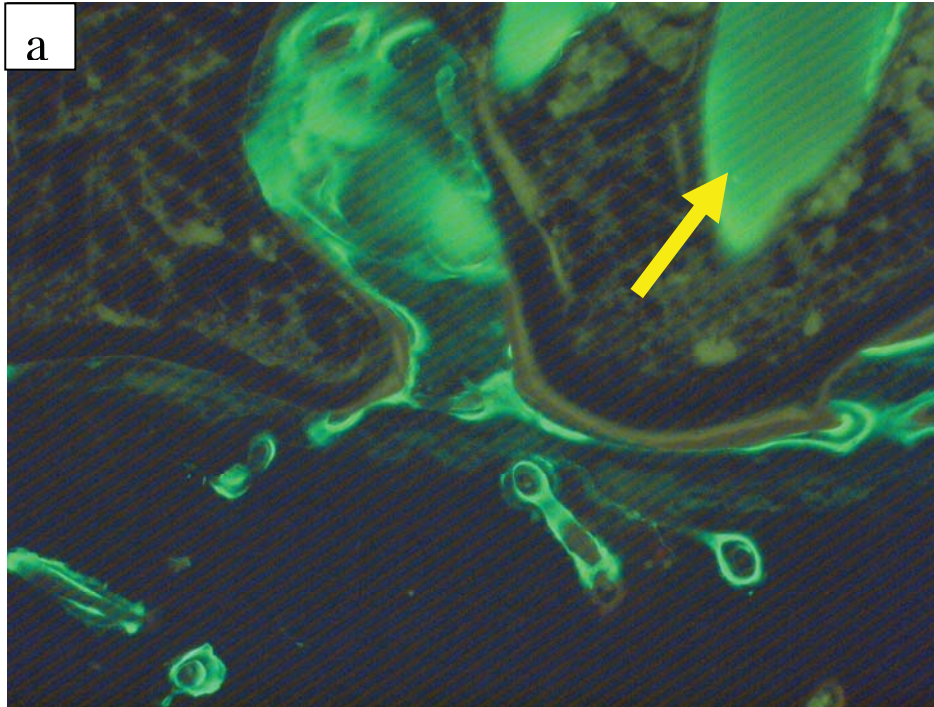
concluir que o defeito ósseo é preenchido, porém com um estímulo menor nas outras fases, o que produz uma ossificação de menor qualidade.



Figuras 31 a e b: Fotomicrografias do grupo **GC1** obtidas após a eutanásia com 56 dias da cirurgia, com marcadores de fluorescência, com aumento de 100 vezes, pela presença intensa da cor verde que houve uma intensa atividade somente nesse período.

B) Grupo Controle 2 (**GC2**), que foi utilizado para preenchimento do leito cirúrgico somente com osso bovino liofilizado

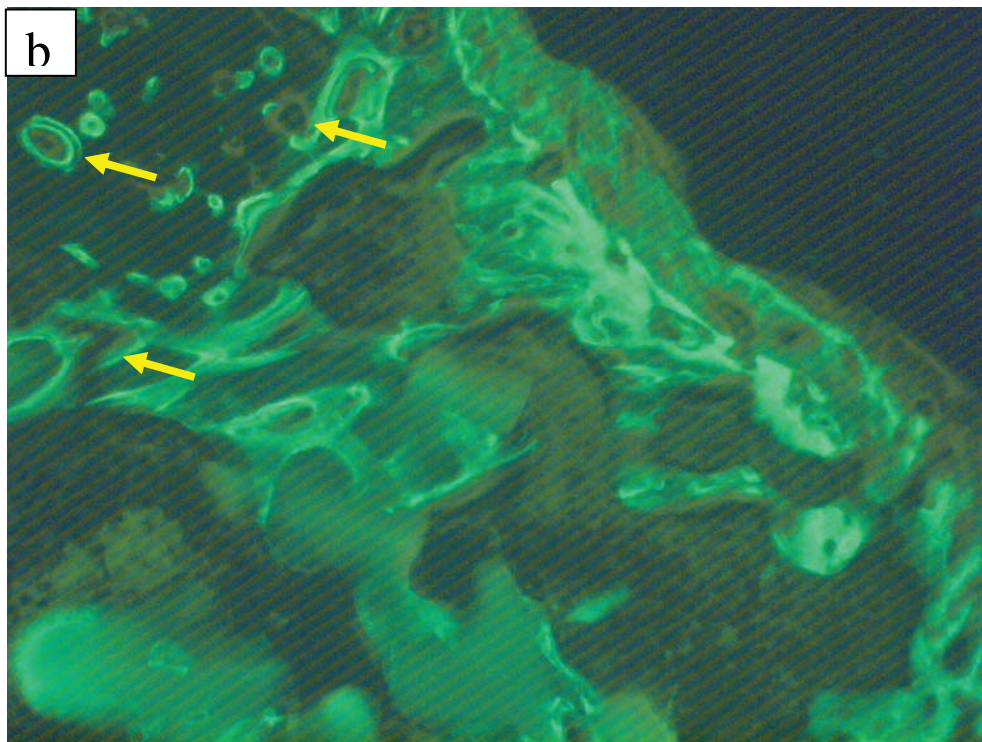
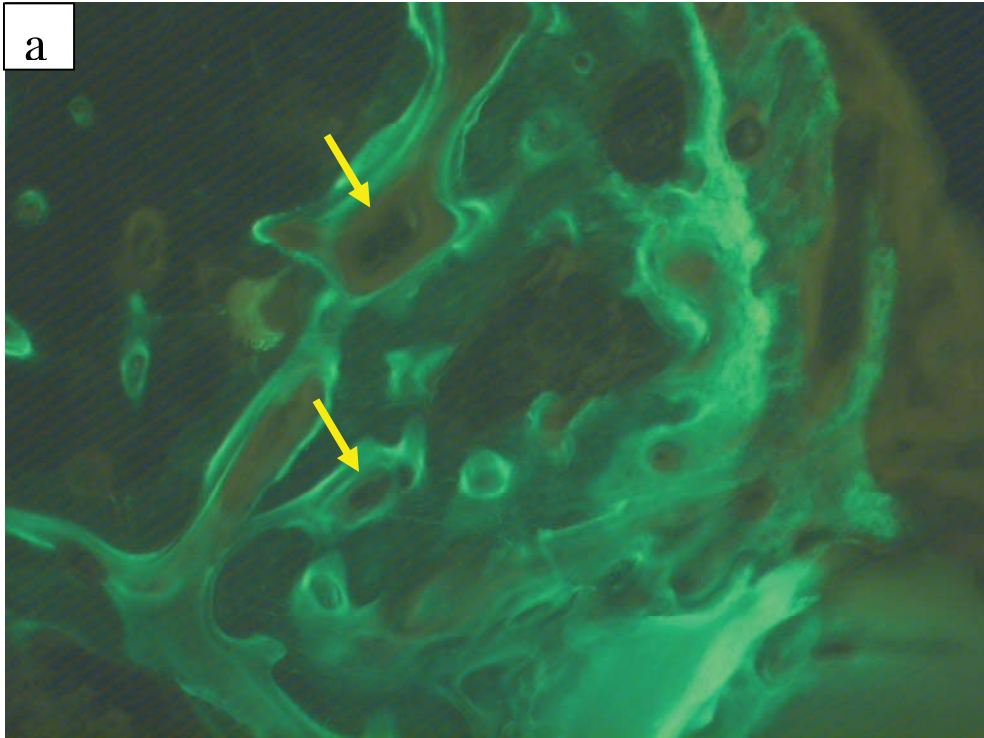
Assim como no grupo anterior, o preenchimento ocorreu mais intensamente no período correspondente ao marcador aplicado entre o período de 21 a 35 dias, representado pela coloração verde. Com o preenchimento do defeito ósseo somente com o osso bovino *Bonefill* pode-se observar em todas as lâminas uma grande presença de grânulos (setas amarelas nas figuras 32 a e b), comprovando que esse material é apenas osteocondutor, pois aparentemente não produziu estímulos diferentes do que foi observado no **GC1**.



Figuras 32 a e b: Fotomicrografias do grupo **GC2** obtidas após a eutanásia com 56 dias da cirurgia, com marcadores de fluorescência, com aumento de 100 vezes, onde podemos verificar a intensa presença da coloração verde e muitas partículas do material enxertado.

C) Grupo experimental (**GE3**), que foi utilizado para preenchimento do leito cirúrgico com osso bovino liofilizado associado a 60% com resveratrol

Nesse grupo, os resultados demonstram que, pela reabsorção quase completa dos grânulos de osso bovino que foram utilizados como meio de sustentação e veículo para o resveratrol e, pela presença de todos os marcadores injetados, houve uma atividade cálcica em todas as fases propostas, com uma melhor organização óssea. A presença de osteonas (setas amarelas) demonstra que o tecido está revascularizado (figuras 33 a e b).



Figuras 33 a e b: Fotomicrografias do grupo **GC3** obtidas após a eutanásia com 56 dias da cirurgia, com marcadores de fluorescência, com aumento de 100 vezes, onde podemos verificar a presença dos diferentes corantes e a presença de osteonas (setas amarelas).