



**Análise estrutural, histoquímica e biomecânica de diferentes membranas biológicas de origem bovina**

**Structural, histochemical and biomechanical analysis of different bovine-derived biological membranes**

**Análisis estructural, histoquímico y biomecánico de diferentes membranas biológicas de origen bovino**

DOI: 10.55905/oelv23n8-078

Receipt of originals: 7/18/2025

Acceptance for publication: 8/8/2025

**Ramayana Ortiz de Sá Menezes**

Graduando em Medicina Veterinária

Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Endereço: Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: 20211300014@pq.uenf.br

**Ana Bárbara Freitas Rodrigues Godinho**

Doutora em Ciência Animal

Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Endereço: Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: anaanatomiaanimal@gmail.com

**Gustavo Silva de Souza**

Mestrando em Medicina Veterinária

Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Endereço: Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: 2gustavo.silva@gmail.com

**Anne Mota Paula**

Graduanda em Medicina Veterinária

Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Endereço: Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: 20211300071@pq.uenf.br

**Bruna de Abreu Silva**

Graduanda em Medicina Veterinária

Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Endereço: Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: 20211300031@pq.uenf.br



**Naíne Guimarães da Silva**

Graduanda em Medicina Veterinária

Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Endereço: Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: naineguimaraes01@gmail.com

**Eulógio Carlos Queiroz Carvalho**

Doutor em Patologia (Anatomia Patológica)

Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Endereço: Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: eulogiocq@icloud.com

**Leonardo Serafim Silveira**

Doutor em Produção Animal

Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Endereço: Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: leoseraf@gmail.com

**Eduardo Atem de Carvalho**

Doutor em Engenharia Mecânica

Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Endereço: Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: eatem@uenf.br

**RESUMO**

Biomateriais são substâncias com capacidade de auxiliar o reparo e regeneração tecidual, sendo o colágeno um exímio biomaterial, utilizado por intermédio de membranas biológicas, como a Túnica Albugínea Testicular (TAT), o Pericárdio Fibroso (PF) e o Centro Tendíneo Diafragmático (CTD). Estes materiais são utilizados como enxerto; entretanto, informações sobre as características histoarquitetônicas e biomecânicas destes ainda são escassas. Assim, o objetivo desta pesquisa é avaliar, comparativamente, as características teciduais e a resistência, contribuindo para validação da eficácia destas biomembranas. Foram utilizados tecidos de bovinos abatidos em frigoríficos, onde, após coleta, foram encaminhados, sob resfriamento, para a Seção de Anatomia dos Animais Domésticos (SAAD/LMPA/CCTA/UENF), onde foram lavados, dissecados, fixados em formol 10% tamponado por 48 horas, conservados por 30 dias em glicerina e, posteriormente, reidratados por 1 hora em soro fisiológico NaCl 0,9%. Amostras de cada biomembrana foram processadas para análise histológica no Setor de Patologia Animal (SPA/LMPA/CCTA/UENF), empregando histotécnicas com colorações de Hematoxilina-Eosina (HE), Picrosirius-Red (PS), Tricrômico de Masson (TM) e Verhoeff-Van Gieson (VVG). Para análise biomecânica, utilizou-se a máquina universal de ensaios Instron (5582) do Laboratório de Materiais Avançados (LMAV/CCT/UENF), onde tiras de 25 mm por 60 mm, fixadas por chapas de alumínio e lixas ferro GR320, foram testadas a 10 mm/min. Constatou-se que a TAT apresenta maior concentração de colágeno tipo III ante o PF e CTD. O PF destacou-se por maior

deformação/resistência à tração, sendo indicado em situações que demandam elasticidade e resistência

**Palavras-chave:** Biomaterial, Resistência, Histoarquitetura, Colágeno.

### ABSTRACT

Biomaterials are substances capable of supporting tissue repair and regeneration, with collagen being an excellent biomaterial, commonly applied through biological membranes such as the Testicular Tunica Albuginea (TTA), Fibrous Pericardium (FP), and Diaphragmatic Central Tendon (DCT). These materials are used as grafts; however, information regarding their histoarchitectural and biomechanical characteristics remains scarce. Therefore, the aim of this study is to comparatively evaluate tissue features and mechanical strength, contributing to the validation of the effectiveness of these biomembranes. Tissues were obtained from bovines slaughtered in abattoirs and, after collection, were transported under refrigeration to the Section of Domestic Animal Anatomy, where they were washed, dissected, fixed in 10% buffered formalin for 48 hours, preserved for 30 days in glycerin, and subsequently rehydrated in 0.9% NaCl saline solution. Samples of each biomembrane were processed for histological analysis at the Animal Pathology Sector, employing staining techniques such as Hematoxylin-Eosin (HE), Picrosirius Red (PS), Masson's Trichrome (MT), and Verhoeff-Van Gieson (VVG). For biomechanical analysis, an Instron universal testing machine (model 5582) from the Laboratory of Advanced Materials was used, with 25 mm × 60 mm strips fixed using aluminum plates and GR320 sandpaper, tested at 10 mm/min. It was found that the TTA shows a higher concentration of type III collagen compared to the FP and DCT, which contain other tissues such as loose connective, muscle, and adipose tissue. FP exhibited greater deformation and tensile strength, indicating its potential in applications requiring elasticity and resistance.

**Keywords:** Biomaterial, Strength, Histoarchitecture, Collagen.

### RESUMEN

Los biomateriales son sustancias con capacidad para auxiliar en la reparación y regeneración tisular, siendo el colágeno un excelente biomaterial, utilizado por intermedio de membranas biológicas, como la Túnica Albugínea Testicular (TAT), el Pericardio Fibroso (PF) y el Centro Tendinoso Diafragmático (CTD). Estos materiales se utilizan como injerto; sin embargo, la información sobre sus características histoarquitectónicas y biomecánicas aún es escasa. Así, el objetivo de esta investigación es evaluar comparativamente las características tisulares y la resistencia, contribuyendo a la validación de la eficacia de estas biomembranas. Se utilizaron tejidos de bovinos sacrificados en mataderos, los cuales, tras su recolección, fueron enviados bajo refrigeración a la Sección de Anatomía de los Animales Domésticos (SAAD/LMPA/CCTA/UENF), donde fueron lavados, disecados, fijados en formol tamponado al 10% durante 48 horas y conservados por 30 días en glicerina. Posteriormente, fueron rehidratados durante 1 hora en suero fisiológico NaCl (0,9%). Muestras de cada biomembrana fueron procesadas para análisis histológico en el Sector

de Patología Animal (SPA/LMPA/CCTA/UENF), empleando tinciones de Hematoxilina-Eosina (HE), Rojo Picrosirius (PS), Tricrómico de Masson (TM) y Verhoeff-Van Gieson (VVG). Para el análisis biomecánico, se utilizó la máquina universal de ensayos Instron (5582) del LAMAV/CCT/UENF, donde tiras de 25 × 60 mm, fijadas por placas de aluminio y lijas GR320, fueron probadas a 10 mm/min. Se constató que la TAT presenta mayor concentración de colágeno tipo III. El PF mostró mayor deformación/resistencia, útil en casos que exigen elasticidad y resistencia.

**Palabras clave:** Biomaterial, Resistencia, Histoarquitectura, Colágeno.

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos denominados de biomateriais, de origem natural ou sintética, como implante na correção de lesões teciduais, vem sendo amplamente estudada, em especial a sua viabilidade, tendo em vista que poucos materiais atendem a todas as exigências importantes para um ótimo biomaterial de implante, tais como, resistência mecânica, resistência à corrosão, biocompatibilidade e textura adequada (Nunes, 2007).

O colágeno é o biomaterial de origem natural mais amplamente utilizado como material de preenchimento, no reparo ósseo, como agente hemostático e na confecção de implantes para as mais diversas especialidades médicas. Como exemplo podemos citar sua aplicação no tratamento de queimaduras e como barreira física na regeneração tecidual guiada (Gasque *et al.*, 2008). Isso se deve a algumas características bem conhecidas, como a biocompatibilidade, a quimiotaxia para fibroblastos, a ativação e atração de neutrófilos e ampla disponibilidade.

Dentre os implantes biológicos, membranas biológicas obtidas de diferentes espécies animais são comumente utilizadas, os quais, mediante processos de reparação, caracterizam-se por fornecer arcabouço, tanto para a orientação, quanto para o desenvolvimento de novos tecidos, restabelecendo a estrutura e a função do órgão afetado (Batista *et al.*, 1996).

Dentre as membranas biológicas mais estudadas, destacam-se o centro tendíneo diafragmático, dura-máter, a fásia lata, o pericárdio, o peritônio e a túnica albugínea que

têm como característica comum a constituição quase exclusivamente de fibras colágenas (Guimarães *et al.*, 2007) dispostas em sentido aleatório, o qual é a característica do tecido conjuntivo denso não- modelado.

## 2 OBJETIVO

Avaliar, de maneira comparativa, a constituição histológica e a resistência das diferentes membranas biológicas oriundas de bovinos.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as características histológicas de cada membrana através de uma análise comparativa;
- Avaliar a biomecânica das diferentes membranas biológicas tendo como principal parâmetro a resistência à tração;
- Avaliar os tipos de fibras de colágeno presentes nas diferentes membranas testadas.

## 3 REFERENCIAL TEÓRICO

As membranas biológicas são biomateriais compostos por tecido conjuntivo denso, caracterizada por uma maior quantidade de fibras colágenas e com baixa celularidade em comparação com o tecido conjuntivo frouxo. O tecido conjuntivo denso não-modelado ou levemente modelado, presente nessas membranas, possui feixes de fibras de colágeno grosseiros entrelaçados, dispostos ao acaso, formando uma rede que resiste a trações de todas as direções (Queiroz *et al.*, 2012).

O colágeno é o biomaterial de origem natural mais utilizado nos procedimentos cirúrgicos devido a algumas características bem conhecidas, como a biocompatibilidade, a quimiotaxia para fibroblastos, ativação e atração de neutrófilos, e ampla disponibilidade. Na escolha do biomaterial adequado é necessário avaliar suas



propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas antes que possam ser usados, determinando a interação hospedeiro-material implantado (Gasque *et al.*, 2008).

Membranas biológicas derivadas de tecidos de animais vêm sendo estudadas e utilizadas principalmente em reparos cirúrgicos de hérnias na medicina veterinária (Marques *et al.* 2015) e como curativos em feridas externas e enxertos (Queiroz *et al.* 2012). Existem inúmeros estudos sobre o uso de diferentes membranas biológicas, como membrana amniótica, submucosa de vesícula urinaria, cápsula renal, submucosa intestinal, pericárdio, peritônio, mucosa oral, túnica vaginal e até escama de sardinha (Dall'agnol, 2017).

O pericárdio bovino é uma membrana biológica comumente usada na Medicina Veterinária em diversas cirurgias reconstrutivas, como em paredes torácicas e abdominais e esofagoplastias (D'ambra *et al.*, 2012), sendo também empregado com sucesso, no tratamento de hérnias (James *et al.*, 1991) e no revestimento de implantes orbitais após a enucleação (Gayre *et al.*, 2001).

O centro tendíneo diafragmático é a estrutura central do músculo diafragma e vem sendo estudado para reconstruções por apresentar menor reatividade e baixo custo (Leal *et al.*, 2014).

Queiroz (2012) avaliou a túnica albugínea testicular bovina em comparação à tela de polipropileno, observando maior reação cicatricial nos implantes com túnica albugínea. Gasque *et al.* (2008) destaca que o colágeno estimula fibroblastos, neutrófilos e macrófagos, aumentando a reação cicatricial. Nesse mesmo estudo, a resistência da túnica albugínea foi alta (média de 19,6 Kg/cm<sup>2</sup>), comparável a materiais de engenharia civil. No entanto, Coutinho (2022) ao avaliar o uso de túnica albugínea testicular bovina e células-tronco em tenorrafias em ratos Wistar observou que, apesar da resistência e do potencial cicatricial, seu uso em tenorrafias não é viável, devido a processos inflamatórios intensos que atrasam a cicatrização dos tendões.

Atualmente é relatado na literatura a existência de cerca de 30 diferentes tipos de colágeno, separados em dois grupos: os fibrilares e não-fibrilares, onde são a principal proteína estrutural da matriz extracelular dos animais (Dias, 2014).

Estruturalmente, o colágeno é composto por fibras, que por sua vez são formadas

por fibrilas e microfibrilas, apresentando uma tripla hélice, possuindo duas cadeias idênticas e uma terceira cadeia que difere em sua composição bioquímica (Silva *et al.*, 2012).

O colágeno tipo I é o mais comum e resistente, representando cerca de 90% do colágeno total em mamíferos, presente em ossos, tendões, córnea e pele. O tipo II absorve choques compressivos e ocorre em cartilagens, humor vítreo e núcleo pulposo. O tipo III auxilia na elasticidade, geralmente associado ao tipo I, sendo encontrado em vasos sanguíneos, pele e tecido de granulação. Já o tipo IV, localizado na membrana basal, é essencial para estabilização celular, aparecendo na pele, rim e olhos (Junqueira *et al.*, 1978; Calvi *et al.*, 2011).

A coloração de Picrosirius-red é capaz de potencializar a birrefringência natural do colágeno quando exposta à luz polarizada (Coelho *et al.*, 2018), onde as fibras de colágeno tipo I apresentam uma coloração amarelo-avermelhada, fibras do tipo II apresentam cores variadas entre azul a um amarelo-claro, a depender da orientação da fibra, e as fibras de tipo III apresentam uma coloração esverdeada (Junqueira *et al.*, 1978). Por mais que essa técnica permita uma análise qualitativa com baixo custo, a mesma apresenta limitações para análises mais minuciosas e precisas. A maioria dos estudos envolvendo o uso dessa coloração se baseiam em técnicas relativamente rudimentares de análises semiquantitativas que apenas deduz um valor aproximado total ou distribuição de cor geral das fibras de colágeno e não um valor específico de análise de fibras individuais na constituição do tecido (Wegner *et al.*, 2017).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Todas as membranas biológicas utilizadas nesta pesquisa foram coletadas em frigoríficos sob inspeção sanitária estadual, em datas específicas de abate de animais oriundos do Norte Fluminense, sob aprovação e conformidade da comissão de ética de uso de animais, sob protocolo CEUA/UENF ID-190712. As amostras de Pericárdio e

Diafragma de 8 animais e 26 testículos, de 13 animais, foram armazenadas em embalagens individuais e acondicionadas em recipientes térmicos com gelo, e encaminhadas para a Seção de Anatomia dos Animais Domésticos (SAAD/LMPA/UENF).

Todas as membranas coletadas foram limpas em água corrente e dissecadas, onde a toailete resultou na separação da porção desejada do tecido, para esta pesquisa, dos demais tecidos presentes nas amostras, como tecido muscular e adiposo. Após o início do processamento, as amostras foram separadas em lotes para estudo histológico, tensiométrico e em uma reserva in natura congelada para futuros testes histológicos e redundância experimental. Para o lote utilizado neste estudo, foram empregados pericárdios e diafragmas, oriundos de 3 animais, e 8 testículos, oriundos de 4 animais.

Para fixação e conservação das amostras, foi escolhido o protocolo de fixação em formol a 10% tamponado por 48 horas e, após esse período, remoção do excesso de fixador com soro fisiológico (NaCl 0,9%) e acondicionamento em recipientes individualizados contendo glicerina P.A. 98% por 30 dias.

#### 4.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

As análises e avaliações histológicas foram realizadas no Setor de Patologia Animal (SPA/LMPA/UENF). A coleta de 8 fragmentos de cada membrana foi feita em dois lotes, sendo um lote após a fixação em formol por 48 horas, totalizando 4 amostras por tecido, e outro lote após 30 dias em conservação em glicerina, totalizando 4 amostras por tecido. A análise em lotes permite avaliar a integridade dos tecidos ao longo do período de processamento com as diferentes soluções empregadas. Após a coleta foi realizado todo o processamento o histotécnico de rotina, com clivagem, acondicionamento em *Histosettes* individualizados e, em seguida, emprego das técnicas de coloração através do método de Hematoxilina- Eosina (H/E), Picrosirius-Red (PRS) e Tricrômico de Masson (TM). A coloração de H/E avalia a constituição histológica geral do tecido, a técnica PRS objetiva realizar uma análise qualitativa das fibras colágenas do tecido conjuntivo, através da diferente interferência de cores, intensidade e

birrefringência dos tecidos corados, diferenciando principalmente as fibras tipo I e tipo III. Já através da técnica de TM é analisado quantitativamente das fibras colágenas nas diferentes membranas.

Para a análise das amostras de PRS e quantificação de colágeno tipo I e tipo III nas fotomicrografias obtidas, foi utilizado o software ImageJ, com o plug-in Threshold Colour, onde é possível quantificar numericamente a quantidade de cada tipo de colágeno presente baseada na cor capturada na imagem gerada. Para padronização, do experimento, utilizaremos a matriz 0-40 para a cor vermelha (colágeno tipo I) e 45-120 para a cor verde (colágeno tipo III), parâmetros semelhantes aos descritos por Bedoya *et al.* (2016). Para análise, foram obtidas fotomicrografias de 16 campos de grande aumento das amostras analisadas em luz polarizada, onde as médias das porcentagens de área das amostras foram obtidas e analisadas sob testes estatísticos para conferir significância dos dados, sob modelo de análise de variâncias ANOVA e teste T de Tukey com  $p < 0,05$ .

#### 4.3 ESTUDO DE RESISTÊNCIA À TRAÇÃO

Os testes tensiométricos foram realizados no Laboratório de Materiais Avançados (LAMAV) do Centro de Ciências e Tecnologia (CCT/UENF). Fragmentos das diferentes membranas foram preparados e analisados com relação à sua capacidade tênsil, onde foi realizado o processo de confecção dos corpos de prova e de reidratação das amostras com soro fisiológico (NaCl 0,9%) pelo período de 1 hora. Para a realização dos testes de resistência à tração, foi utilizada uma máquina universal de ensaios *INSTRON*, do Laboratório de Materiais Avançados. Os ensaios de resistência à tração axial foram realizados com velocidade de ensaio de 10 mm/min sob célula de carga estática de 100kN.

O estudo tensiométrico compreenderá a análise da resistência à tração axial e do deslocamento da amostra até a ruptura. A resistência à tração (em MPa) foi calculada a partir da razão entre a força de ruptura (em N) e a área da seção transversal da amostra (em mm<sup>2</sup>). Para demais análises o valor obtido em N/mm<sup>2</sup> foi convertido para Kg/cm<sup>2</sup>, ao multiplicar o valor obtido em MPa por 10,2 (1 MPa = 10,2 Kg/cm<sup>2</sup>). A comparação entre os diferentes resultados dos ensaios tensiométricos foi feita por comparação entre

médias, com nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o teste T de Tukey e modelo de análise de variâncias ANOVA, por auxílio do software *Excel*®.

#### 4.3.1 Metodologia para confecção de corpos de prova

Por não haver um padrão bem estabelecido para amostras de resistência em materiais biológicos (Arroyave, 2015), desenvolvemos o padrão de 25mm de largura e 60mm de comprimento e, como auxílio para evitar danos nos tecidos em teste, foram utilizadas chapas de alumínio de 20 por 25 milímetros e lixas ferro GR320, de mesmo tamanho das chapas de alumínio, adicionadas a fim de evitar que os corpos de prova escorregassem da máquina universal de ensaios durante os testes. As chapas de metal e as lixas foram fixadas nas membranas em teste por intermédio de cola de Etil Cianoacrilato, comercialmente conhecida como *TEKBOND 793*®.

A fim de coletar dados para correção e cálculos para o estudo da resistência em tração, foram medidas e registradas as espessuras de cada membrana em estudo, com auxílio de um paquímetro digital.

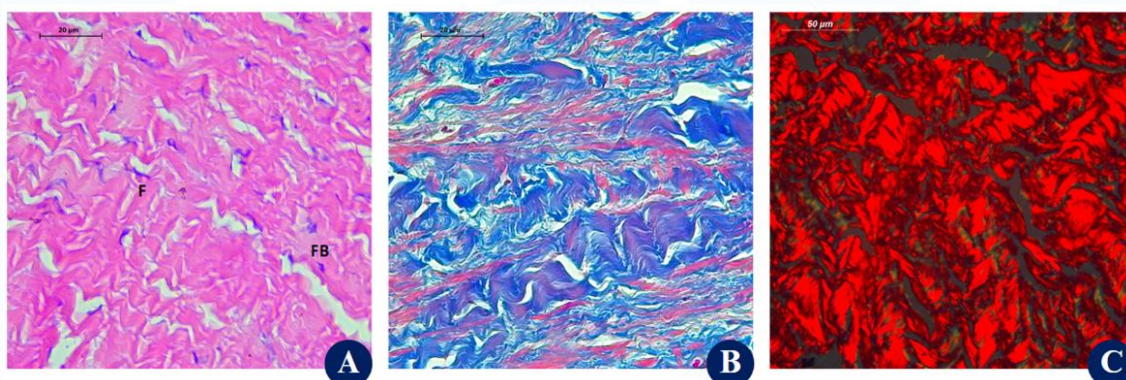
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 MICROSCOPIA DO PERICÁRDIO BOVINO

A análise de amostras de pericárdio, sob microscopia de luz, em Tricrômico de Masson demonstram presença de fibras de colágeno onduladas, sendo estruturalmente perfeito, indicando ser um tecido com boa resistência física. Já em Hematoxilina-Eosina, é possível diferenciar a presença de fibroblastos, de núcleo mais arredondado, e presença de fibrócitos, com núcleo mais alongado. Vale salientar que não houve diferenciação tecidual entre as amostras conservadas em formol e glicerina, havendo, somente, uma leve diminuição da afinidade tintorial do tecido pela Eosina nas amostras conservadas em glicerina.

Para a análise em Picosirius-Red, foi observado, sob microscopia por luz polarizada, uma maior quantidade de fibras colágenas de tipo I, de coloração avermelhada, e, em menor quantidade, fibras colágenas de tipo III, de coloração esverdeada. Assim, é possível afirmar que há uma maior concentração de fibras colágenas de tipo I na constituição do pericárdio fibroso, caracterizando-o como tecido conjuntivo denso não-modelado

Figura 1. A) Fotomicrografia do Pericárdio Fibroso em H/E, com presença de fibrócitos (F) e fibroblastos (FB) – aumento de 40x; B) Fotomicrografia de PF em TM – aumento de 40x; C) Fotomicrografia de PF sob luz polarizada em coloração de PSR com fibras de colágeno tipo I (Vermelho) e tipo III (Verde) – aumento de 40x.



Fonte: Arquivo pessoal.

## 5.2 MICROSCOPIA DO CENTRO TENDÍNEO DIAFRAGMÁTICO BOVINO

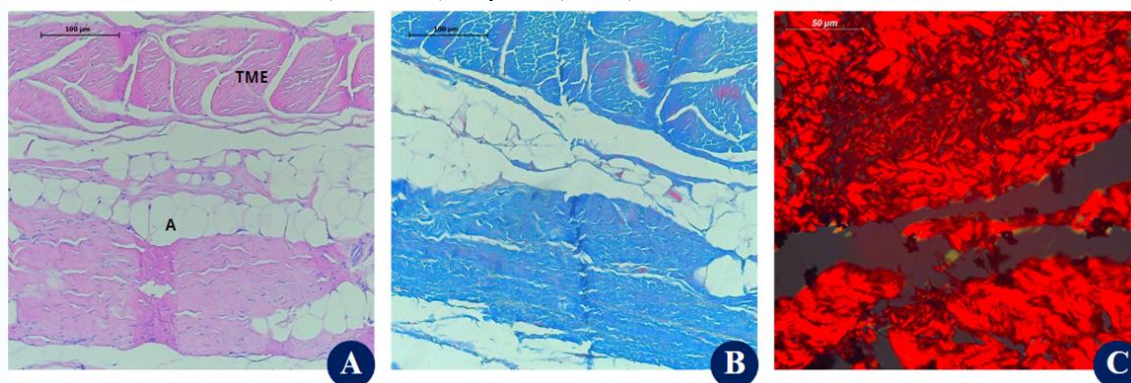
A análise de amostras do centro tendíneo diafragmático em Tricrômico de Masson demonstram presença de fibras de colágeno onduladas, em interação com diferentes tipos teciduais, em especial, tecido adiposo e tecido muscular estriado esquelético. Já em Hematoxilina-Eosina, é possível diferenciar a presença de fibroblastos, de núcleo mais arredondado, e presença de fibrócitos, com núcleo mais alongado, com fibras colágenas entremeadas a adipócitos. Pode ser observado uma leve perda de afinidade tintorial nas amostras conservadas em glicerina, como observado no pericárdio, mas sem diferenciação quanto a morfologia e histoarquitetura das amostras.

Para a análise em Picosirius-Red, foi observado, sob microscopia por luz polarizada, uma maior quantidade de fibras colágenas de tipo I, de coloração

avermelhada, e, em menor quantidade, fibras colágenas de tipo III, de coloração esverdeada na totalidade do tecido.

Vale salientar que uma maior presença de fibras colágenas, de coloração esverdeada de tipo III, na periferia do tecido, pode ser explicada pela presença de tecido conjuntivo frouxo nessa região, diferente do tecido conjuntivo denso não-modelado presente em maior quantidade, com presença de fibras colágenas de tipo I, no centro do tecido.

Figura 2. A) Fotomicrografia do CTD em H/E, com presença de fibrócitos, fibroblastos, adipócitos (A) e Tecido Muscular Esquelético (TME) – aumento de 10x; B) Fotomicrografia de CTD em TM – aumento de 10x; C) Fotomicrografia de CDT sob luz polarizada em coloração de PSR, com fibras de colágeno tipo I (Vermelho) e tipo III (Verde) – aumento de 40x.



Fonte: Arquivo pessoal.

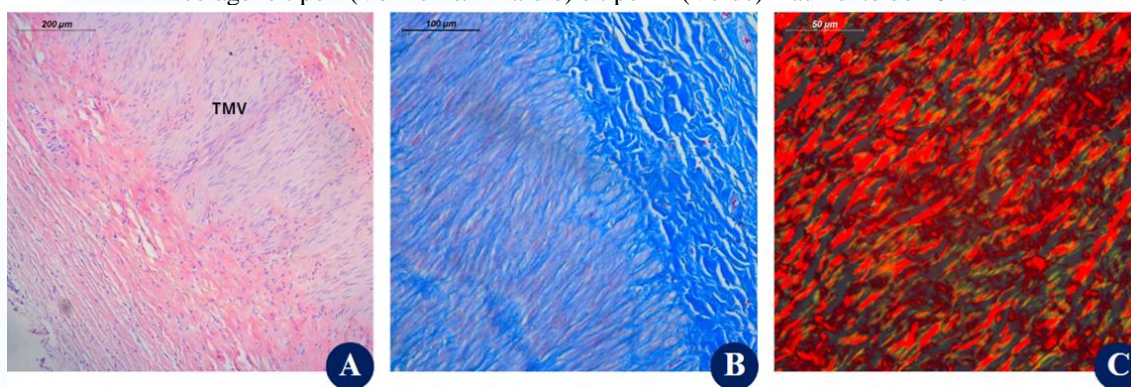
### 5.3 MICROSCOPIA DA TÚNICA ALBUGÍNEA TESTICULAR

A análise de amostras da túnica albugínea testicular em Tricrômico de Masson demonstram presença de fibras de colágeno onduladas, em interação com tecido muscular vascular, dada a alta vascularização do tecido, estando relacionado com o mecanismo de termorregulação do sistema reprodutor masculino. Já em Hematoxilina-Eosina, é possível diferenciar a presença de fibroblastos, de núcleo mais arredondado, a presença de fibrócitos, com núcleo mais alongado, e a presença do tecido muscular vascular, além da perda de afinidade tintorial nas amostras conservadas em glicerina, como foi mencionado.

Para a análise em Picrosirius-Red, foi observado, sob microscopia por luz polarizada, uma maior quantidade de fibras colágenas de coloração avermelhada, e,

diferentemente dos demais tecidos em estudo, apresentou uma grande quantidade de fibras colágenas de tipo III, de coloração esverdeada, estando entremeadas na totalidade da constituição tecidual.

Figura 3. A) Fotomicrografia da túnica albugínea testicular em H/E, com presença de fibrócitos, fibroblastos e tecido muscular vascular (TMV) – aumento de 5x; B) Fotomicrografia de TAT em TM – aumento de 10x; C) Fotomicrografia de TAT sob luz polarizada em coloração de PSR, com fibras de colágeno tipo I (Vermelho/Amarelo) e tipo III (Verde) – aumento de 40x.



Fonte: Arquivo pessoal.

#### 5.4 MORFOMETRIA DE COLÁGENO TIPO III

Após análise estatística, comprovando diferenças significativas entre os dados obtidos, se obteve dados de que a túnica albugínea testicular (TAT) apresentou maior proporção de colágeno de tipo III em sua composição tecidual, seguido do centro tendíneo diafragmático (CTD) e do pericárdio fibroso (PF).

Figura 4. A) Fotomicrografia de TAT sob luz polarizada em coloração de PSR, com fibras de colágeno tipo I (Vermelho/Amarelo) tipo III (Verde) – aumento de 40x; B) Fotomicrografia de TAT na aplicação *ImageJ* com a opção *Threshold Colour* para morfometria de colágeno de tipo III; C) Fotomicrografia de TAT na aplicação *ImageJ* após *Threshold* para quantificação de partículas.



Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 1. Resultados de morfometria de colágeno tipo III e estudo estatístico

Tecidos	Média de Colágeno Tipo III (%)	Variância	Desvio Padrão
PF (n=16)	0,201875	0,01217	0,11032
CTD (n=16)	0,249062	0,01506	0,12272
TAT (n=16)	1,004625	0,47317	0,68787

Fonte: Arquivo pessoal.

## 5.5 TESTES TENSIOMÉTRICOS

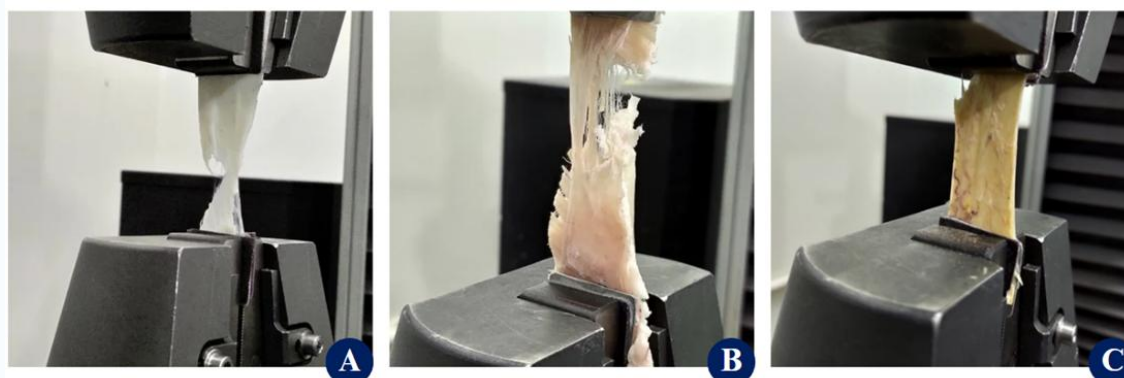
Os testes foram realizados seguindo a metodologia descrita para a desidratação, preparo dos corpos de prova e parâmetros de testes, onde foi possível obter resultados significativos com a metodologia desenvolvida neste estudo para ensaios em materiais biológicos.

Figura 5. A, B e C) Processo de montagem do corpo de prova, com identificação das amostras, reidratação dos tecidos e união das chapas aos tecidos em análise, respectivamente.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 6. A) Pericárdio em teste de tração. B) Centro tendíneo diafragmático em teste de tração. C) Túnica Albugínea Testicular em teste de tração.



Fonte: Arquivo pessoal.

Após os testes, os valores obtidos foram convertidos para a mesma unidade de medida, com a correção dos dados em relação à área do corpo de prova, como definido na metodologia, foi comprovado pela análise estatística que o pericárdio fibroso apresenta a maior resistência em comparação com os tecidos em análise, seguido da túnica albugínea testicular e do centro tendíneo diafragmático.

Tabela 2. Resultados de teste de tração e estudo estatístico.

Tecidos	Média em Kg/cm <sup>2</sup>	Variância	Desvio Padrão
PF (n=12)	134,411	2685,037	51,817
CTD (n=12)	65,987	2146,150	46,326
TAT (n=12)	79,545	878,325	29,636

Fonte: Arquivo pessoal.

## 5.6 DISCUSSÃO DE RESULTADOS MICROSCÓPICOS

Com a definição dos tecidos utilizados no experimento como tecido conjuntivo denso não-modelado ou levemente modelado, esses tecidos variam na densidade de fibras colágenas e na presença de tecido adiposo. Essa variação influencia a resistência tênsil e pode provocar respostas inflamatórias indesejadas, como descrito por Coutinho *et al.* (2022), e rejeição do enxerto aplicado em contexto cirúrgico (Azevedo *et al.*, 2018). Dessa forma, em biomembranas com alta concentração de adipócitos, como o centro tendíneo diafragmático, é necessário maior atenção ao processo cicatricial da lesão enxertada com esta biomembrana, mas não é um fator proibitivo para seu uso.

A túnica albugínea testicular, em sua composição, possui a maior concentração de colágeno de tipo III, em comparação às demais biomembranas em estudo, que possuem maior concentração de colágeno de tipo I, o que é justificado pelo colágeno de tipo I ser o mais comum e resistente, representando cerca de 90% do colágeno total em mamíferos (Calvi, *et al.*, 2011).

Em relação à elasticidade, se esperava que a resistência dos tecidos com maior concentração de colágeno de tipo III fossem maiores, devido à característica mais elástica deste colágeno, presente em tecidos que demandam certa elasticidade, como pele, músculos, fâscias e ligamentos, como descrito por Calvi *et al.* (2011). No entanto, com os resultados tensiométricos, estes dados foram colocados em prova, com a alta resistência do pericárdio fibroso, basicamente constituído em sua maior parte de colágeno de tipo I. Estes resultados poderiam ser explicados pela presença de outras substâncias ou

microcomponentes teciduais presentes na composição desta biomembrana em análise, o que requer mais estudos para elucidá-los.

Vale ressaltar que todos os tecidos em análise mantiveram sua composição histológica durante o processo de conservação, sem perder suas características e propriedades, demonstrando a capacidade de, em correto processamento e acondicionamento, permanecer sob estoques e serem utilizados quando necessário após reidratação do tecido.

### 5.7 DISCUSSÃO DE RESULTADOS TENSIO MÉTRICOS

Com os testes realizados nesta pesquisa, foi possível desenvolver e aplicar uma metodologia eficiente para ensaios em materiais biológicos, o que não é facilmente encontrado em pesquisas envolvendo a engenharia de materiais, devido à alta variabilidade dos tecidos e sua não padronização geral, como comumente ocorre em pesquisas envolvendo a análise de diferentes materiais, como ligas metálicas e polímeros, como citado por Arroyave (2015)

A partir das análises, constatou-se que o pericárdio apresenta maior resistência a tração em comparação ao centro tendíneo diafragmático e túnica albugínea testicular corroborado pelo teste de análise de variâncias ANOVA, havendo diferenças significantes entre os grupos testados, mesmo obtendo uma variância alta, o que pode ser justificado pela alta variabilidade de tecidos biológicos ensaiados, em comparação com outros materiais comumente ensaiados na engenharia de materiais, como chapas metálicas.

Vale salientar que os resultados obtidos neste experimento não estão consoantes aos valores encontrados e descritos por Queiroz (2012), onde a túnica albugínea testicular apresentou um valor de resistência a tração 4 vezes maior nos testes realizados nesta pesquisa.

## 6 CONCLUSÃO

As membranas biológicas, por sua composição rica em colágeno, biomaterial promissor para a aplicação e auxílio cicatricial em cirurgias reconstrutivas na medicina veterinária, onde sua origem natural confere biocompatibilidade, estímulo à regeneração tecidual e integração eficiente ao receptor. No entanto, é necessário planejar sua aplicação devido à característica específica de colágeno e demais tecidos presentes na constituição de cada biomembrana, como a presença de tecido adiposo, por exemplo, que pode levar a alterações inflamatórias e até na resistência mecânica da biomembrana aplicada.

O entendimento das propriedades físico-químicas e biológicas destas membranas, associado às soluções utilizadas para a fixação e conservação, em especial, a técnica de conservação em glicerina P.A. 98%, é fundamental para garantir a manutenção e capacidade do biomaterial em atingir seu objetivo quanto enxerto, mesmo após certo período de armazenamento. Por sua vez, a caracterização de colágeno por métodos histoquímicos, ainda que efetiva em análises qualitativas preliminares, ainda é defasada em quesito de análises quantitativas mais precisas. Ademais, ainda que aberta para aprimoramentos, a técnica de confecção de corpos de prova se demonstrou eficiente, podendo servir como base para pesquisas semelhantes.

Em suma, estudos adicionais são necessários para aprofundar a avaliação da resposta biológica das referidas membranas, em diferentes contextos cirúrgicos, na Medicina Veterinária.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), nossa instituição de origem, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), que, por meio dos programas de bolsas de iniciação científica (PIBIC/UENF), possibilitaram a realização deste estudo. Expressamos também nossa gratidão aos colaboradores diretos e indiretos desta pesquisa, cujas contribuições foram fundamentais para alcançarmos nossos objetivos e resultados.

## REFERÊNCIAS

ARROYAVE, A. I. G **Metodologia para caracterização mecânica de tecido biológico mole**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2015.

AZEVEDO, R. A; STOPIGLIA, A. J.; Principais materiais biológicos e sintéticos utilizados em cirurgias para reconstrução de parede abdominal na Medicina Veterinária: revisão de literature. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 16, n. 2, p. 42-46, 2018.

BATISTA, L. C.; DALECK, C. R.; SHIMANO, A. C.; ALESSI, A.C.; ABRAHÃO, M. S. Estudo comparativo da resistência à tração do peritônio (bovino, equino, suíno e canino) a fresco e conservado em glicerina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 33, p. 305-312, 1996.

BEDOYA, S. A. O.; CONCEIÇÃO, L. G.; VILORIA, M.I.V.; LOURES, F.H.; VALENTE, F. L.; AMORIM, R. L.; SILVA, F. F. Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 68, n. 1, p.147-154, 2016.

COELHO, P.G.B.; SOUZA, M.V.; CONCEIÇÃO, L.G.; VILORIA, M.I.V.; BEDOYA, S.A.O. Evaluation of dermal collagen stained with picosirius red and examined under polarized light microscopy. **An Bras Dermatol**. v. 93, n. 3, p. 415-418, 2018.

COUTINHO, I.S. **Avaliação morfológica e microbiológica da túnica albugínea testicular bovina e células tronco como potenciais reparadoras da técnica de tenorrafia em ratos Wistar**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes – RJ, 2022.

D'AMBRA, L.; BERTI, S.; FELEPPA, C.; MAGISTRELLI, P.; BONFANTE, P.; FALCO, E. Use of bovine pericardium graft for abdominal wall reconstruction in contaminated fields. **World Journal of Gastrointestinal Surgery**, Beijing, v. 4, n. 7, p. 171-176, 2012.

DALL'AGNOL, C.C. **Membranas biológicas na córnea de cães e gatos**. 2017. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

CALVI, E. N. C.; NAHAS, F. X.; BARBOSA, M. V. J.; IHARA, S. S. M.; CALIL, J. A.; FERREIRA, L. M. Immunohistochemical analysis of collagen content and types in

the rectus abdominis muscle of cadavers of different ages. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 26, n. 2, 2011.

DIAS, F. G. F. **Análise Imunohistoquímica do Efeito do Recobrimento com Gel Purificado de Colágeno na Integração de Telas de Polipropileno em Ratas**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências da Cirurgia) - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas, Campinas - SP, 2014.

GASQUE, K. C. S. *et al.* Avaliação da biocompatibilidade de uma membrana de pericárdio bovino acelular e seu potencial como carreador de osteoblastos. **Ciência Odontológica Brasileira**, v.11, n.1, p.58-66, 34 2008.

GAYRE, G.S. *et al.* Bovine pericardium as a wrapping for orbital implants. **Ophthalmic Plast Reconstr Surg**, v.17, n.5, p.381-387, 2001.

GUIMARÃES, G. C.; SCAVONE, A. R. F.; MACHADO, M. R. F.; CRUZ, C.; CAPALBO, A. C.; SANTOS, A. L. Q. Avaliação histológica de membranas biológicas bovinas conservadas em glicerina e a fresco. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, p. 120-127, 2007.

JAMES, N.L. *et al.* Comparative evaluation of treated bovine pericardium as a xenograft for hernia repair. **Biomaterials**, v.12, n.9, p.801-809, 1991.

JUNQUEIRA, L. C. U.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential Staining of Collagens Type I, II and III by Sirius Red and Polarization Microscopy. **Arch. histol. jap.**, v. 41, n. 3, p. 267-274, 1978.

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**, Belo Horizonte, v. 66, n. 5, p. 1383-1391, 2014.

MARQUES, D. R. C.; RUSSO, C.; IBAÑEZ, J. F. Utilização de pericárdio bovino conservado em glicerina 98% na herniorrafia perineal em cães - relato de 12 casos. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.**, UNIPAR, Umuarama, v. 18, n. 3, p. 185-190, 2015.

NUNES, V. A. **Enxerto de túnica albugínea como reforço de parede abdominal em cães**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro – RJ, 2007.

SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 71, n. 3, p. 530-9, 2012.



WEGNER, K. A.; KEIKHOSRAVI, A.; ELICEIRI, K. W.; VEZINA, C. M.  
Fluorescence of Picrosirius Red Multiplexed with Immunohistochemistry for the  
Quantitative Assessment of Collagen in Tissue Sections. **Journal of Histochemistry &  
Cytochemistry**, v. 65, n. 8, p. 479–490, 2017.