Thaís da Silveira Rodrigues

Avaliação da dinâmica do Processo de Reparo Alveolar utilizando fluorocromos

Thaís da Silveira Rodrigues

Avaliação da dinâmica do processo de reparo alveolar utilizando fluorocromos

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – Unesp, para a obtenção do Grau de "Mestre em Odontologia" – Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Poi
Co-orientadora: Profa. Dra. Roberta Okamoto

ARAÇATUBA – SP
- 2005 -

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

Rodrigues, Thaís da Silveira
R696a Avaliação da dinâmica do processo de reparo alveolar utilizando fluorocromos / Thaís da Silveira Rodrigues. - Araçatuba : [s.n.], 2005
103 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2005
Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Poi
Co-orientador: Profa. Dra. Roberta Okamoto

1. Reparo alveolar 2. Processo alveolar 3. Corantes fluorescentes

Black D7
CDD 617.64

Dados Curriculares

NASCIMENTO..... : 07.06.1979 – Goiânia/GO

FILIAÇÃO ..... : João Rodrigues Filho
Maria Luzia da Silveira Rodrigues

1999/2002 ..... : Curso de Graduação na Faculdade de Odontologia de Araçatuba -UNESP

2003..... : Aluna Especial do Mestrado na Faculdade de Odontologia de Araçatuba –UNESP

2004/2005 ..... : Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

Dedicatória

Dedicatória

A Deus, por me permitir chegar aqui ao lado dos que amo.

À minha mãe, Maria Luzia, porto seguro nos momentos de tormenta e calmaria. Pelo seu exemplo, dedicação, esforço e confiança, sempre acreditando em meus sonhos, por mais absurdos que fossem. Esta conquista também é sua.

Aos meus irmãos, Alexksander e Lara, dos quais me orgulho muito. Crescer ao lado de vocês foi maravilhoso. Obrigada pelo apoio incondicional.

Ao meu orientador, Wilson Roberto Poi, pelos grandes exemplos de perseverança na busca de um ideal, pela orientação segura e pela amizade sincera. Obrigada pela presença constante, pelos grandes ensinamentos de vida, os conselhos nas horas certas e principalmente pelo carinho com que me acolheu. E MUITO obrigada por acreditar em mim!

À Isabel Cristina Lui Poi, alavanca que me impulsionou a prosseguir. Obrigada pela amizade e convivência.

Agradecimentos Especiais

Agradecimentos Especiais

À minha co-orientadora, Roberta Okamoto, exemplo de dedicação ao trabalho. Obrigada pelo companheirismo nesta jornada... Sua presença foi imprescindível.

Ao Professor Idelmo Rangel Garcia Júnior, exemplo de liderança tranqüila. Obrigada pela base sólida que contribuiu, não apenas para a minha formação profissional, mas também me ensinou a ser uma pessoa melhor.

Ao Professor Osvaldo Magro Filho, pela amizade, convivência e oportunidade de aprendizado.

À Professora Ana Maria Pires Soubhia, pelo exemplo de coragem e trabalho. Obrigada pelos ensinamentos e companheirismo demonstrados durante todo o nosso convívio.

Aos professores da Clínica Integrada: Celso Koogi Sonoda, Sônia Regina Panzarini Barioni, Denise Pedrini, José Carlos Monteiro de Castro e Daniela Brandini que com sabedoria e disposição para o ensino, contribuíram marcantemente na minha formação.

Aos meus amigos do coração Flávia, Melaine, Joãozinho, Leandro, Aline e Helen pelo apoio, companheirismo e incentivo indispensáveis durante todos esses anos.

Agradecimentos

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Aos colegas do Curso de pós-graduação pela amizade e companheirismo durante esta jornada: André Dotto Sottovia, Paulo Almeida Júnior, Thais Mara Manfrin, Jordan Lima da Silva, Fernando Esgaib Kayatt, Natasha Magro Érnica, José Luiz Rodrigues Leles, Fábio Tanaka, Vinícius Canavarros Palma, Carolina Chiantelli Cláudio, Cristiano Gaujac, Eduardo Francisco Faco, Marcelo Kayatt Lacoski, Eleonor Álvaro Garbin Júnior, Paulo Domingos Ribeiro Júnior, Liliane Scheidegger da Silva Zanetti, Camila Benez Ricieri, Francisley Ávila Souza, Jéssica Lemos Gulinelli e Thallita Pereira Queiroz.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – Unesp: Helena, Ana Cláudia, Isabel, Izamar, Cláudio, Ivone, Cláudia, Luzia, Maria Cláudia, Marina, Alexandra e Jéssica pela atenção com que nos atendem e, em especial, pela revisão bibliográfica realizada pela Isabel e Ana Cláudia.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Lourdes Soares Traficante, Glauco José de Carvalho, Maria Dirce C. Boatto, Gilmar Martins de Oliveira, Bernadete Maria Nunes Kimura, Ana Claúdia Macedo e Antônia.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – Unesp: Marina e Valéria, que sempre nos auxiliam com boa vontade.

Aos funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP: Marcelo, Cida, Luzia, Elaine e Mirian, pela ajuda constante.

Ao Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, pela disponibilidade e apoio para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Oficina da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, que permitiram a utilização de equipamentos necessários à pesquisa.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), pelo auxílio financeiro que viabilizou a realização desse trabalho de pesquisa.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram com este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Epígrafe

Epígrafe

"Pros erros há perdão;

pros fracassos, chance;

pros amores impossíveis, tempo.

De nada adianta cercar um coração vazio ou economizar alma.

O romance cujo fim é instantâneo ou indolor não é romance.

Não deixe que a saudade sufoque,

que a rotina acomode,

que o medo impeça de tentar.

Desconfie do destino e acredite em você.

Gaste mais horas realizando que sonhando,

fazendo que planejando,

vivendo que esperando,

porque embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu."

Luís Fernando Veríssimo

Sumário

Lista de Figuras 13

Introdução Geral 17

Capítulo 1 - Avaliação da dinâmica do processo de reparo em feridas de extração dental em ratos utilizando fluorocromos. 21

- Resumo 23
- Abstract 25
- 1. Introdução 27
- 2. Proposição 31
- 3. Material e Método 33
- 4. Resultado 38
- 5. Discussão 41
- 6. Conclusão 45
- 7. Referências 47

Capítulo 2 - Avaliação da dinâmica do processo de reparo alveolar após o uso da pasta de metronidazol a 10% e lidocaína a 2% utilizando fluorocromos. 52

- Resumo 54
- Abstract 56
- 1. Introdução 58
- 2. Proposição 62
- 3. Material e Método 64
- 4. Resultado 70
- 5. Discussão 78
- 6. Conclusão 83
- 7. Referências 85

Anexos 93

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1 - Osso neoformado aos 6 dias, representado pela calceína predominantemente na parede lingual do alvéolo. 50

Figura 2 - Osso neoformado aos 15 dias, representado pela alizarina, ocupando grande parte do terço médio do alvéolo. 50

Figura 3 - Osso neoformado aos 21 dias, representado pela oxitetraciclina, observando-se uma menor quantidade de tecido ósseo formado, quando comparado à marcação da alizarina. 50

Figura 4 - A sobreposição das imagens possibilita evidenciar o tecido ósseo formado em cada período. 50

Capítulo 2

Figura 1 Grupo I - Calceína, 6 dias. 89

Figura 2 Grupo I - H E, 6 dias. 89

Figura 3 Grupo I - Alizarina, 15 dias. 89

Figura 4 Grupo I - H E, 15 dias. 89

Figura 5 Grupo I - Oxitetraciclina, 21 dias. 89

Figura 6 Grupo I - H E, 21 dias. 89

Figura 7 Grupo I - Sobreposição das imagens. 89

Figura 8 Grupo II - Calceína, 6 dias. 90

Figura 9 Grupo II - H E, 6 dias. 90

Figura 10 Grupo II - Alizarina, 15 dias. 90

Figura 11 Grupo II - H E, 15 dias. 90

Figura 12 Grupo II - Oxitetraciclina, 21 dias. 90

Figura 13 Grupo II - H E, 21 dias. 90

Figura 14	Grupo II - Sobreposição das imagens.	90
Figura 15	Grupo III - Calceína, 6 dias.	91
Figura 16	Grupo III - H E, 6 dias.	91
Figura 17	Grupo III - Alizarina, 15 dias.	91
Figura 18	Grupo III - H E, 15 dias.	91
Figura 19	Grupo III - Oxitetraciclina, 21 dias.	91
Figura 20	Grupo III - H E, 21 dias.	91
Figura 21	Grupo III - Sobreposição das imagens.	91
	Anexos	
Figura 1	Anestesia.	94
Figura 2	Sindesmotomia.	94
Figura 3	Luxação.	94
Figura 4	Extração.	94
Figura 5	Cone de papel com adrenalina.	94
Figura 6	Alvéolo após isquemia.	94
Figura 7	Alvéolo com pasta.	94
Figura 8	Sutura.	94
Figura 9	Oxitetraciclina.	95
Figura 10	Primeira fase da injeção.	95
Figura 11	Andamento da injeção.	95
Figura 12	Final da injeção.	95
Figura 13	Peça incluída.	96
Figura 14	Calceína.	96
Figura 15	Alizarina.	96
Figura 16	Oxitetraciclina.	96

Figura 17	Esmeril utilizado para o desgaste das peças.	96
Figura 18	Ferramenta “arquivo” e abertura de uma nova imagem com os dados originais das imagens previamente capturadas.	97
Figura 19	Ferramenta “arquivo” e abertura das três imagens originais.	97
Figura 20	Ferramenta “mover” para selecionar e arrastar a imagem da oxitetraciclina para o novo arquivo.	98
Figura 21	Ferramenta “mover” para selecionar e arrastar a imagem da alizarina para sobrepô-la a imagem da oxitetraciclina.	98
Figura 22	Utilização da ferramenta “varinha mágica” para selecionar as áreas da imagem não coradas pelo fluorocromo alizarina.	99
Figura 23	Ferramenta “delete” para eliminação da área selecionada.	99
Figura 24	Ferramenta “mover” para selecionar e arrastar a imagem da calceína para sobrepô-la às duas imagens**.**	100
Figura 25	Utilização da ferramenta “varinha mágica” para selecionar as áreas da imagem não coradas pelo fluorocromo calceína.	100
Figura 26	Ferramenta “delete” para a eliminação da área selecionada e obtenção da imagem sobreposta.	101

Introdução Geral

Introdução Geral

O processo de reparo alveolar em feridas de extração dental é definido como o conjunto de reações teciduais desencadeadas no interior do alvéolo seguida à exodontia. Desta forma, é importante o conhecimento não só dos mecanismos envolvidos no processo de reparo, como também de seus fatores predisponentes.

Entre os fatores de ordem local que interferem no processo de reparo alveolar estão: (1) as complicações ou traumas provenientes da técnica cirúrgica, como a fratura dental, a fratura de tábua óssea ou de cristas alveolares; (2) as alveolectomias; (3) a utilização de brocas e cinzéis; (4) os cuidados pós-exodônticos, como a curetagem abusiva ou inadequada e a irrigação excessiva com soro fisiológico; (5) os efeitos proporcionados pela irrigação alveolar com anestésicos locais e/ou infiltração em seus tecidos adjacentes e (6) as condições periodontais e infecções.

Diversas metodologias têm sido empregadas no estudo do processo de reparo alveolar, sendo que as pesquisas têm utilizado como metodologia principal a análise de cortes histológicos obtidos em parafina e corados por hematoxilina e eosina.

Entretanto, tem-se observado a utilização de novas metodologias que permitem a obtenção de respostas cada vez mais específicas,

buscando-se um melhor entendimento dos processos que envolvam a biologia óssea dentro do processo de reparo alveolar. Metodologias como imunocitoquímica, PCR, hibridização *in situ* têm sido cada vez mais utilizadas dentro da odontologia com intuito de se obter respostas cada vez mais voltadas para aspectos celulares.

Uma ferramenta metodológica que tem sido bastante solicitada é a injeção de fluorocromos em períodos diferentes, buscando-se uma visão integrada da dinâmica do tecido ósseo formado em diferentes momentos. Tem sido utilizada principalmente em trabalhos que analisam o processo de osseointegração, uma vez que evidenciam o período em que houve o processo de neoformação óssea formado em contato com os implantes.

Em função das respostas proporcionadas por esta metodologia consideramos de alto grau de interesse utilizá-la para analisar o processo de reparo alveolar em ratos, buscando um enfoque para o processo da dinâmica do tecido ósseo, possibilitada pela injeção dos diferentes fluorocromos em diferentes períodos.

Considerando que o processo de reparo alveolar e a sua cronologia já estejam bem definidos histologicamente, neste trabalho realizamos apenas a análise do tecido ósseo formado e marcado por cada fluorocromo utilizado.

Sendo assim, este trabalho foi desenvolvido em dois capítulos, nos quais se enfocaram os parâmetros acima mencionados.

O primeiro capítulo, *"Avaliação da dinâmica do processo de reparo em feridas de extração dental em ratos utilizando fluorocromos"*, apresenta uma metodologia que possibilita a utilização dos fluorocromos como forma de análise do processo de reparo alveolar.

O segundo capítulo, *"Avaliação da dinâmica do processo de reparo alveolar após o uso da pasta de metronidazol a 10% e lidocaína a 2% utilizando fluorocromos"*, refere-se à utilização desta metodologia para analisar qualitativamente a interferência de fatores locais que poderiam alterar a cronologia do processo de reparo alveolar.

Vale destacar que os fatores locais analisados foram a isquemia do alvéolo, bem como a interferência da aplicação da pasta de metronidazol a 10% e lidocaína a 2% no interior do alvéolo, tomando por basa e orientação estudos realizados anteriormente.

Capítulo 1

Capítulo 1

Avaliação da dinâmica do processo de reparo em feridas de extração dental em ratos utilizando fluorocromos

Resumo

Resumo

Rodrigues TS. Avaliação da dinâmica do processo de reparo em feridas de extração dental em ratos utilizando fluorocromos. Araçatuba, 2005. 101p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

Diversas metodologias têm sido empregadas no estudo do processo de reparo alveolar. Em razão disso, o propósito deste trabalho é apresentar uma metodologia que possibilite a utilização dos fluorocromos como forma de análise do processo de reparo alveolar. Para tanto, 5 ratos tiveram o incisivo central superior direito extraído. Aos 6 dias foi injetada a calceína, aos 15 dias a alizarina e aos 21 dias a oxitetraciclina. Após 35 dias esses animais foram sacrificados. Obtidas as peças, foi analisado o terço médio do alvéolo. Observou-se predominância de calceína junto à parede lingual, grande quantidade de marcação com alizarina e a marcação da oxitetraciclina em menor quantidade, mostrando que houve menor taxa de mineralização óssea. Este trabalho foi capaz de mostrar a dinâmica do processo de reparo alveolar de forma clara e bastante ilustrativa, além de ser de fácil reprodução e apresentar um custo relativamente baixo.

Palavras-chave: Reparo alveolar, Processo alveolar, Corantes fluorescentes.

Abstract

Abstract

Rodrigues TS. Dynamic evaluation of the repair process in dental extraction wounds in rats, using fluorochromes. Araçatuba, 2005. 101p. Thesis (Master's Degree in Oromaxillofacial Surgery and Traumatology) – Dental School, Paulista State University.

Several methods have been employed in the study of the alveolar repair process. For this reason, the aim of this study is to present a methodology that allows the use of fluorochromes in the analysis of this process. Thus, 5 rats had their upper right central incisors extracted. At day 6 calcein was injected, at day 15 alizarin was injected, and at day 21, oxytetracycline was injected. After 35 days the animals were euthanized. After the samples were obtained, the middle third of the socket was analyzed. Predominance of calcein was observed next to the lingual wall. A great amount of alizarin staining and a smaller amount of oxytetracycline staining were also observed, showing that there was a smaller rate of bone mineralization. This study was able to show the dynamics of the socket repair process in a clear and illustrative manner, besides being easy to reproduce and relatively inexpensive.

Keywords: Alveolar repair, Alveolar process, Fluorescents colours.

Introdução

1 Introdução

Embora a Odontologia Preventiva tenha adquirido elevada importância nos últimos anos, a extração dental ainda está entre os procedimentos cirúrgicos mais realizados na cavidade bucal.[1] Por isso, torna-se importante o conhecimento das alterações celulares ocorridas no interior do alvéolo, sobretudo, o conhecimento da biologia e fisiologia dos tecidos e células para que o procedimento cirúrgico possa ser exercido corretamente, garantindo solidez à sua execução.

Vários animais são utilizados para o estudo do processo de reparo alveolar.[2] No entanto, o rato,[1,3-7] o cão[8] e o macaco[9] são os mais pesquisados. Apesar das variações cronológicas entre eles, os eventos são muito semelhantes, sendo possível definir as principais características comuns da histogênese do reparo.[3,9,10]

A sequência da reparação alveolar pode ser descrita, em linhas gerais, como se segue: (1) formação do coágulo; (2) substituição do coágulo por tecido de granulação; (3) substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo; (4) surgimento do tecido osteóide; (5) amadurecimento gradativo da matriz óssea e; (6) epitelização da ferida cirúrgica.[4,10-12]

De acordo com Carvalho e Okamoto (1987),[13] a reparação alveolar será considerada completa quando o alvéolo estiver preenchido por

tecido ósseo neoformado e a crista alveolar remodelada, havendo, assim, um equilíbrio dinâmico osteoclástico-osteoblástico e o novo osso em condições de suportar estímulos. Isso pode ser observado em rato por volta do 21° dia após a exodontia,[5,14] em cão, no 48° dia,[15] no macaco, no 56° dia[9] e no homem após o 64° dia.[10,13,16]

Diversas metodologias têm sido empregadas para o estudo do processo de reparo alveolar, tais como: imunocitoquímica,[17] , PCR, hibridização *in situ,* histológica,[13,18,19] , histométrica,[18-20] apresentando-se relevantes na maioria dos trabalhos, sejam associadas ou não a outros métodos de estudo.

A injeção de fluorocromos é uma metodologia que está sendo bastante utilizada em Odontologia, especialmente, na área de Implantodontia, pois permite a visualização da dinâmica da osseointegração.

Ottoni e Chopard (2004)[21] avaliaram a quantidade de osso neoformado em fêmurs de ratos diabéticos, utilizando os fluorocromos calceína, alizarina e oxitetraciclina.

Papalexiou e cols (2004)[22] observaram a influência da microestrutura do implante na dinâmica do processo de reparo ósseo ao redor de implantes imediatos inseridos em sítios periodontalmente infectados. Foram utilizados como fluorocromos a calceína, a alizarina e a tetraciclina e a visualização dos cortes foi feita em microscópio confocal.

Dessa forma, em razão da ausência de estudos utilizando fluorocromos para a avaliação do processo de reparo alveolar tornou-se viável a realização deste estudo.

Proposição

2 Proposição

Este trabalho tem o propósito de apresentar uma metodologia que possibilite a utilização dos fluorocromos como forma de análise do processo de reparo alveolar.

Material e Método

3 Material e Método

Após aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus Araçatuba, foram utilizados, neste experimento, 5 ratos *(Rattus norevegicus albicans*, Wistar) machos, com idade variando entre 70 a 90 dias, pesando aproximadamente 250 a 300 gramas.

Procedentes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, os animais foram transportados ao Biotério do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada e mantidos em gaiolas comuns. Os animais apresentavam-se, clinicamente, livres de qualquer entidade patológica.

Antes e durante a fase experimental, os animais receberam ração sólida (Ração Ativada Produtor-Anderson & Clayton S. A.), com exceção das primeiras 24 horas pós-cirurgia, na qual essa alimentação foi triturada. Durante todo o período experimental todos os animais receberam água à vontade.

Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Quetamina (Vetaset - Fort Dodge) e Xilazina (Coopazine – Coopers Brasil Ltda), mediante injeção intramuscular, na dosagem de 0,2 e 0,1 mL para cada 250 gramas de peso corpóreo, respectivamente. Após anti-sepsia da área cirúrgica com Dermoidine (Gessy Lever Indústria Farmacêutica Ltda.), o incisivo superior de cada animal foi extraído de acordo com a técnica descrita por Okamoto e Russo (1973).[5]

As bordas dos alvéolos de todos os animais foram coaptadas por meio de sutura com fio de seda 4.0 (Ethicon), com o objetivo de evitar o deslocamento do coágulo.

Após seis dias foram iniciadas as injeções dos fluorocromos (20mg/Kg de peso corporal) por via intramuscular, para posterior análise em microscopia de fluorescência das camadas de tecido ósseo. Aos 6 dias foi injetada a calceína (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA), aos 15 dias a alizarina (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) e aos 21 dias a oxitetraciclina (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA). A eutanásia dos animais foi realizada após 35 dias por injeção excessiva de anestésico.

As peças obtidas foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos - Dinâmica). Após a fixação, as peças passaram pela etapa de desidratação a partir da seqüência crescente de álcoois (70, 80, 90 e 100), com troca de solução a cada 3 dias, sendo agitadas (Agitador orbital, Kline CT-150, Cientec – equipamentos para laboratório) todos os dias, durante 4 horas.

Ao término da desidratação as peças foram imersas em acetona (Synth) por 24 horas e, na seqüência, iniciaram-se os banhos em monômero metil metacrilato (JET - Artigos Odontológicos Clássico Ltda, Indústria Brasileira), sendo que o primeiro e o segundo banhos tiveram a duração de 24 horas cada. Para a realização do terceiro banho, foi acrescentado ao monômero um catalizador, o peróxido de benzoila (Riedel – De Haën AG, Seelze – Hannover) na concentração de 1%.

Em seguida, as peças foram colocadas individualmente em tubos

de ensaio com tampa e permaneceram imersas neste terceiro banho até que o monômero polimerizasse. Este processo durou aproximadamente 72 horas à temperatura ambiente.

Após a polimerização, os blocos com as peças foram desgastados em esmeril. Em seguida, estes cortes chegaram a espessura de 100µm, através do desgaste manual em lixas d'água (3M).

Os cortes obtidos foram colocados em lâmina de vidro e as lamínulas foram montadas utilizando o nujol (Schering- Plough) como meio de montagem. Após a fixação das lamínulas, as bordas foram isoladas com esmalte cosmético para evitar o ressecamento dos cortes.

Para análise qualitativa foi utilizado um microscópio de epifluorescência (Axiophot, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)**,** com filtros específicos para cada fluorocromo, ou seja, filtro com fotomultiplicador no valor de 488 para a calceína, 594 para a alizarina e luz ultavioleta com fotomultiplicador no valor de 368 para a oxitetraciclina, correspondentes ao comprimento de onda excitado por cada fluorocromo.

Para aquisição das imagens utilizou-se uma câmera digital acoplada a um microscópio de epifluorescência (Axiophot, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) e conectada ao computador. Para padronização da análise capturou-se a região de terço médio de todos os alvéolos.

Para ilustração da dinâmica do processo de reparo alveolar foi realizada a sobreposição das imagens obtidas a partir de cada fluorocromo utilizado. Para a sobreposição das imagens foi utilizado o

aplicativo Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems Incorporated). Os passos foram os seguintes: (1) ferramenta “arquivo” e abertura de uma nova imagem com fundo transparente, 150dpis de resolução e tamanho 22,01 X 17,2cm, respeitando os dados originais das imagens previamente capturadas; (2) ferramenta “arquivo” e abertura das 3 imagens originais; (3) ferramenta “mover” para selecionar e arrastar a imagem da oxitetracilcina para o novo arquivo; (4) ferramenta “mover” para selecionar e arrastar a imagem da alizarina para sobrepô-la a imagem da oxitetraciclina; (5) utilização da ferramenta “varinha mágica” com tolerância 10 e suavização de serilhado para selecionar as áreas da imagem não coradas pelo fluorocromo alizarina; (6) ferramenta “delete” para eliminação da área selecionada; (7) ferramenta “mover” para selecionar e arrastar a imagem da calceína para sobrepô-la às outras duas imagens; (7) utilização da ferramenta “varinha mágica” para selecionar as áreas da imagem não corados pelo fluorocromo calceína; (8) ferramenta “delete” para a eliminação da área selecionada e obtenção da imagem sobreposta.

Resultado

4 Resultado

Para a descrição dos resultados foi realizada uma análise qualitativa dos períodos pós-operatórios, considerando as ocorrências verificadas no terço médio do alvéolo dental.

A exposição dos achados aponta a dinâmica do processo de reparo alveolar, através das marcações com fluorocromos, que apresentam-se como faixas representativas do tecido ósseo formado no dia da injeção.

Aos 6 dias, o osso neoformado é representado pela calceína, visualizada na cor verde. Observa-se marcação predominante deste fluorocromo junto à parede lingual, mostrando que houve formação de tecido ósseo na região do terço analisado (Figura 1).

Aos 15 dias, a injeção de alizarina, promoveu a marcação em vermelho do tecido ósseo formado. Observa-se que esta marcação apresenta-se ocupando grande parte do terço médio do alvéolo, evidenciando a quantidade de tecido ósseo formado neste período (Figura 2).

Aos 21 dias, a injeção de oxitetraciclina, possibilita observar tecido ósseo marcado em azul (Figura 3). Observa-se uma menor quantidade de tecido ósseo formado neste período, quando comparado à marcação da alizarina no período de 15 dias.

A sobreposição das imagens possibilita evidenciar o tecido ósseo formado em cada período, portanto, é possível observar a predominância da calceína (6 dias) junto à parede lingual, bem como a grande quantidade de marcação da alizarina (15 dias) em todo o terço médio analisado e a marcação da oxitetraciclina (21 dias) em menor quantidade que a alizarina, mostrando que neste último período houve menor taxa de neoformação óssea (Figura 4).

Discussão

5 Discussão

A metodologia empregada, no tocante à utilização do alvéolo dentário do rato, foi baseada no trabalho de OKAMOTO & RUSSO, 1973, que deu origem a um expressivo número de pesquisas ao longo desse tempo, destacando a análise de cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina. Neste modelo experimental é possível, guardadas as proporções de resistência do animal e cronologia do processo de reparo alveolar, simular as situações que poderiam ocorrer em seres humanos.

A utilização de fluorocromos para análise do processo de reparação em feridas de extração dentária em ratos, justifica-se pelo pequeno número de trabalhos publicados. Em contrapartida, esta metodologia é encontrada em muitas pesquisas relacionadas à osseointegração[21-26] para a visualização da dinâmica do processo de neoformação óssea, que possibilita a evidência conjunta e/ou individualizada do tecido ósseo formado em cada período analisado.

Desta forma, as grandes vantagens da utilização desta técnica são: a diminuição da amostra, em função das injeções dos fluorocromos serem realizadas no mesmo animal e a análise dos períodos do processo de reparo no mesmo animal, o que diminui a variabilidade. Outra característica desta metodologia é que não se evidenciam células,

apenas as faixas fluorescentes, que mostram o processo de neoformação óssea.

Considerando que o osso sofre constante processo de reabsorção-aposição, vale lembrar que a menor quantidade de calceína está relacionada, também, ao processo de reabsorção do tecido ósseo que ocorreu durante o processo de reparo que, provavelmente, há uma predominância da oxitetraciclina no terço cervical do alvéolo, uma vez que, a reparação é centrípeta.

Houve uma grande dificuldade para o desenvolvimento deste trabalho em função das dimensões do alvéolo do rato. A literatura mostra que quando se utiliza esta técnica os cortes são obtidos em micrótomo específico para tecido duro. Entretanto, há uma dificuldade muito grande em se obter o corte exatamente no centro do alvéolo. Portanto, considerou-se que o desgaste do corte possibilitaria um melhor controle para obtenção de uma peça mais ilustrativa. Assim, o primeiro desgaste foi realizado com o esmeril e, posteriormente, foi realizado o desgaste manual com as lixas de várias espessuras.

Essa é a grande diferença da metodologia clássica apresentada na literatura. No entanto, como os resultados foram semelhantes aos achados histológicos, pode-se inferir que o método foi bem sucedido. Além disso, vale considerar que os custos foram bem menores, que a sua reprodutibilidade não exige equipamentos sofisticados e é relativamente fácil.

Alguns aspectos importantes foram observados, tais como: (1) o

início da ossificação a partir do ligamento periodontal, marcado pela calceína; (2) o período intermediário da injeção (15 dias), com predomínio de alizarina no terço médio do alvéolo, confirmando-se que o período de maior deposição óssea é a segunda semana e (3) o caráter predominante da oxitetraciclina (21 dias) no terço cervical do alvéolo, demonstrando que o processo de reparo ocorre, realmente, da periferia para o centro do alvéolo, uma vez que esta foi a última injeção realizada. Com o objetivo de estabelecer uma padronização na análise dos resultados de trabalhos futuros, o terço avaliado foi o médio.

Os resultados obtidos mostram que a metodologia está bem indicada para o modelo experimental utilizado e abre a perspectiva para a realização de várias outras pesquisas.

Conclusão

6 Conclusão

A utilização dos fluorocromos foi capaz de mostrar a dinâmica do processo de reparo alveolar de forma clara e bastante ilustrativa, além de ser de fácil reprodução e apresentar um custo relativamente baixo.

Referências

7 Referências

1 Johansen JR. Repair of the post-extraction alveolus in the Wistar rat: a histologic and autoradiographic study. Acta Odontol Scand, 1970; 28:441-61.

2 Sanches MG, Okamoto T, Carvalho AC. Processo de reparo em feridas de extração dental após implante de “osso anorgânico”: estudo histológico em ratos. Rev Fac Odontol Araçatuba,1972;1:83-90.

3 Huebsch RF, Coleman RD, Frandsen AM, Becks H. The healing process following molar extraction: I. Normal male rats. J Oral Surg, 1952;5:864-76.

4 Boyne PJ. Osseous repair of the postextraction alveolus in man. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1966;21:805-13.

5 Okamoto T, de Russo MC. Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats. Rev Fac Odontol Araçatuba, 1973;2:153-69.

6 Smith NA. Comparative histological and radiographic study of extraction socket healing in the rat. Aust Dent J, 1974;19:250-4.

7 Carvalho TLL, Bombonato KF, Brentegani LG. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. Braz Dent J, 1997;8:9-12.

8 Caflin RS. Healing of disturbed and undisturbed extraction wounds. J Am Dent Assoc, 1936;23:945-59.

9 Simpson HE. The healing of extraction wounds. Br Dent J, 1969;126:550-7.

10 Amler MH. The time sequence of the tissue regeneration in human extraction wounds. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1969;27:309-18.

11 Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed

1. As referências no texto estão de acordo com as normas da revista Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology, para a qual o trabalho será enviado.

extraction wounds. J Am Dent Assoc, 1960;61:32-44.

12 Amler MH. Age factor in human alveolar bone repair. J Oral Implantol, 1993;19:138-42.

13 Carvalho ACP, Okamoto T. Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados à clínica. São Paulo: Médica Panamericana, 1987. 139p.

14 Carvalho A, Castro AL, Santos-Pinto R, Santos-Pinto MC. Mineralização no processo de reparo em feridas de extração dental em ratos: contribuição ao estudo densitométrico. Ars Curandi Odontol, 1980;7:304-12.

15 Huebsch RF, Hansen LS. A histopathologic study of extraction wounds in gogs. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1969;28:187-96.

16 Gregori C, Santos-Pinto R. Processo de reparo em feridas de extração dentária – IV aula. Ars Cvrandi Odontol, 1978; 5:52-9.

17 Shirakura M, Fujii N, Ohnishi H, Taguchi Y, Ohshima H, Nomura S, Maeda T. Tissue response to titanium implantation in the rat maxilla, with special reference to the effects of surface conditions on bone formation. Clin Oral Implants Res, 2003; 4:687-96.

18 Poi WR Carvalho PSP, Okamoto T, Andrade ED, Panzarini SR. Influência da pasta à base de metronidazol a 10 por cento e lidocaína a 2 por cento sobre o processo de reparo em alvéolo dental infectado: análise histológica e histométrica em ratos. Rev Odontol UNESP, 1998; 27:53-72.

19 Poi WR, Carvalho PSP, Andrade ED. Nova pasta para o tratamento da alveolite: estudo histológico do comportamento do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos ao implante de uma pasta à base de metronidazol a 10 por cento e lidocaína a 2 por cento. RGO (Porto Alegre), 1999;47:102-4.

20 Isaka J, Ohazama A, Kobayashi M, Nagashima C, Takiguchi T,

Kawasaki H, Tachikawa T, Hasegawa K. Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. J Periodontol, 2001;72:314-23.

21 Ottoni CE, Chopard RP. Histomorphometric evaluation of new bone formation in diabetic rats submitted to insertion of temporary implants. Braz Dent J, 2004;15:87-92.

22 Papalexiou V, Novaes AB Jr, Grisi MF, Souza SS, Taba M Jr, Kajiwara JK. Influence of implant microstructure o the dynamics of bone healing around immediate implants placed into periodontally infected sites. A confocal laser scanning microscopic study. J Clin Oral Implants Res, 2004;15: 44-53.

23 Koo S, Konig B Jr, Yoshimoto M, Carbonari MJ, Mitri-Luiz F. Titanium implant osseointegration with calcium pyrophosphate in rabbits. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005;23.

24 Xiropaidis AV, Oahash M, Lim WH, Shanaman RH, Rohrer MD, Wikesjo UM, Hall J. Bone-implant contact at calcium phosphate-coated and porous titanium oxide (TiUnite)-modified oral implants. Clin Oral Implants Res 2005;16:532-9.

25 Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Osawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. J Periodont Res 2002;37:161-5.

26 Iyama S, Takeshita F, Ayukawa Y, Kido MA, Suetsugu T, Tanaka T. A study of the regional distribution of bone formed around hydroxyapatite implants in the tibiae of streptozotocin-induced diabetic rats using multiple fluorescent labeling and confocal laser scanning microscopy. J Periodontol, 1997; 68:1169-75.

ILUSTRAÇÕES E LEGENDAS

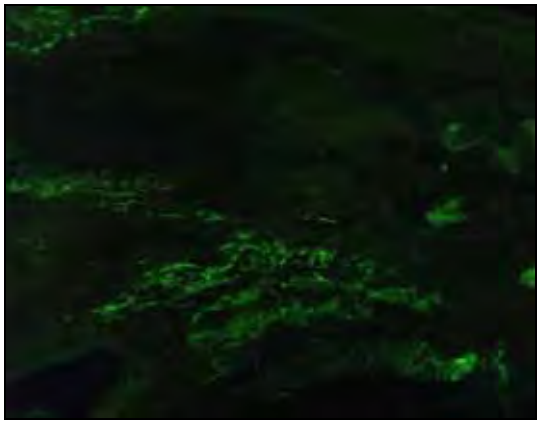


Figura 1 - Osso neoformado aos 6 dias, representado pela calceína na parede lingual do alvéolo.

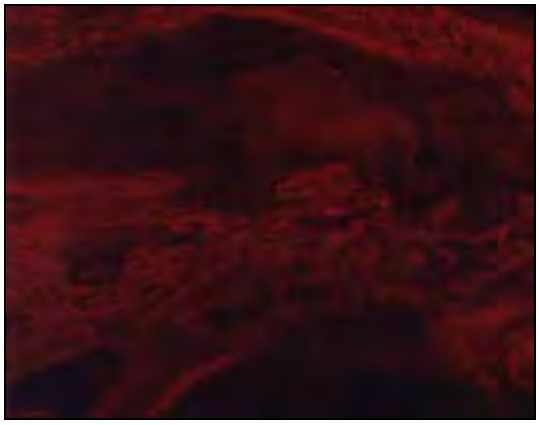


Figura 2 - Osso neoformado aos 15 dias, representado pela alizarina, ocupando grande parte do terço médio do alvéolo.

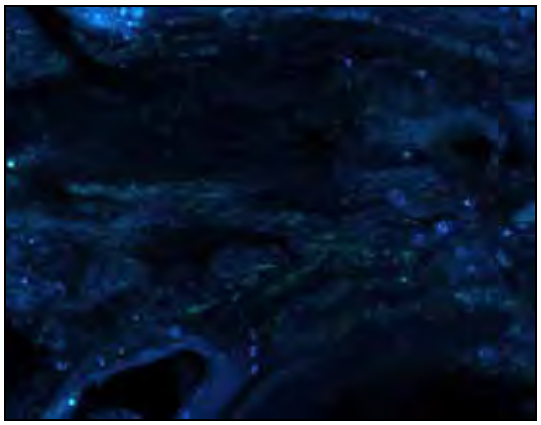


Figura 3 - Osso neoformado aos 21 dias, representado pela oxitetraciclina, observando-se uma menor quantidade de tecido ósseo formado, quando comparado à marcação da alizarina.

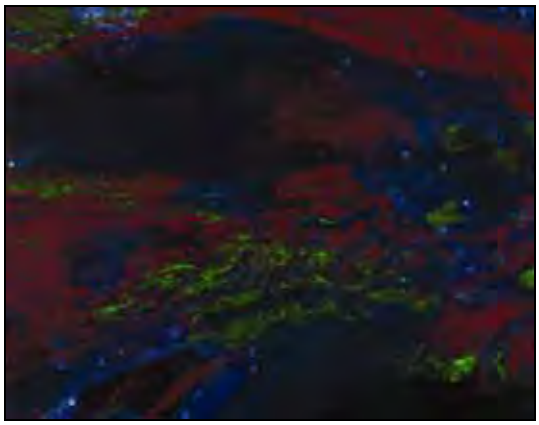


Figura 4 - A sobreposição das imagens possibilita evidenciar o tecido ósseo formado em cada período.

Capítulo 2

Capítulo 2

Avaliação da dinâmica do processo de reparo alveolar, após o uso da pasta de metronidazol a 10% e lidocaína a 2%, utilizando fluorocromos

Resumo

Resumo

Rodrigues TS. Avaliação da dinâmica do processo de reparo alveolar após o uso da pasta de metronidazol a 10% e lidocaína a 2%, utilizando fluorocromos. Araçatuba, 2005. 101p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

Pesquisas mostram que várias substâncias foram testadas no interior do alvéolo para evitar a instalação da alveolite. O propósito deste trabalho é avaliar o processo de reparo em alvéolos dentários, após a aplicação de uma pasta à base de metronidazol a 10%, lidocaína a 2%, utilizando fluorocromos. Sessenta animais tiveram o incisivo central superior direito extraído e constituíram os seguintes grupos: I – controle; II – isquemia provocada pela aplicação de adrenalina a 1:1000 e preenchimento do alvéolo com a pasta; III – preenchimento com a pasta. Aos 6, 15 e 21 dias foram realizadas as injeções de calceína, alizarina e oxitetraciclina. Aos 35 dias foi realizado o sacrifício destes animais. A eutanásia dos outros 45 ratos foi realizada nos períodos de 6, 15 e 21 dias, para análise em microscopia de luz. O Grupo I mostrou melhores resultados quando comparado aos Grupos II e III. A pasta pode ser utilizada nos casos com insuficiente suprimento sangüíneo.

Palavras-chave: Reparo alveolar, Processo alveolar, Corantes fluorescentes.

Abstract

Abstract

Rodrigues TS. Dynamic evaluation using fluorochromes of the alveolar repair process after the use of a 10% metronidazole and 2% lidocaine ointment. Araçatuba, 2005. 101p. Thesis (Master's Degree in Oromaxillofacial Surgery and Traumatology) – Dental School, Paulista State University.

Research has shown that several substances have been tested inside the socket to avoid the onset of alveolitis. The aim of this study is to evaluate, with the use of fluorochromes, the process of repair in tooth sockets, after the application of an ointment with 10% metronidazole and 2% lidocaine. Sixty animals had their upper right central incisors extracted and were distributed to the following groups: I – control; II – ischemia provoked by the application of 1:1000 adrenaline and filling the socket with the ointment; III – filling the socket with the ointment. Five animals of each group were injected via intramuscular with calcein on day 6, with alizarin on day 15, and with oxytetracycline on day 21. On day 35 these animals were euthanized. The euthanasia of the other 45 rats was carried out at 6, 15 and 21 days (5 animals of each group at each time interval) for analysis under a light microscope. Group I showed the best results when compared to Groups II and III. The ointment was able to prevent the onset of alveolitis after ischemia.

Keywords: Alveolar repair, Alveolar process, Fluorescents colours.

Introdução

1 Introdução

O processo de reparo alveolar tem sido amplamente estudado tanto em humanos[1] como em animais,[2] e as pesquisas mostram que as várias substâncias testadas em seu interior levam a um atraso desse processo, porém, em algumas situações, essas substâncias podem evitar a instalação de patologias como a alveolite, caracterizada pela desintegração do coágulo com infecção das paredes alveolares e extremamente dolorido.[2]

Suas causas são: (1) insuficiente suprimento sangüíneo no alvéolo; (2) aumento da atividade fibrinolítica no coágulo sangüíneo; (3) presença de infecção durante ou após a extração; e (4) trauma do osso alveolar durante o ato operatório.[3-5] Vários são, também, os seus fatores predisponentes, tais como a quantidade de microrganismos presentes na cavidade bucal,[3] idade,[5] uso de contraceptivos orais,[6] local de extração e tipo de dente extraído[4] e tabaco.[7]

Nos últimos anos, a presença de microrganismos anaeróbios tem sido apontada como um dos principais fatores responsáveis pela instalação desta patologia. Tal fato despertou o interesse de vários pesquisadores, instituindo tratamentos que visam ao controle específico de tais agentes.[8-11] Dentre eles, o metronidazol destaca-se pelo fato de eliminar os microrganismos patogênicos anaeróbios e não alterar a flora aeróbia comensal,[8] além de mostrar-se pouco irritante ao tecido

conjuntivo subcutâneo de rato[12] e apresentar compatibilidade biológica quando em contato com o alvéolo dental infectado de rato.[10,11]

O metronidazol, um composto antiparasitário e antibacteriano, é uma das drogas mais utilizadas no mundo.[13] Em odontologia, além da via sistêmica de administração, muitos estudos foram realizados com a aplicação tópica da droga no tratamento das periodontopatias,[14,15] associada ou não à raspagem e alisamento dentário,[16] e no tratamento das alveolites.[10,11]

A pasta com metronidazol a 10%, lidocaína a 2%, menta e lanolina como veículo foi utilizada apenas em alvéolos infectados,[10-12] fato que sugere uma aplicação em lojas livres de infecção instalada, simulando uma situação clínica em que haja algum fator predisponente envolvido, apesar do aparente estado de normalidade das paredes alveolares.

Um procedimento experimental que tem sido utilizado para um estudo mais refinado, direcionado a formação de tecido ósseo durante o processo de reparação, é a injeção de fluorocromos em vários períodos diferentes para a visualização das camadas de tecido neoformado. A utilização de fluorocromos diferentes e análise do material utilizando diferentes filtros no microscópio de fluorescência possibilitam a visualização das camadas de tecido ósseo neoformado a cada período em que foi injetado o marcador.

Iyama e cols (1997)[17] evidenciaram as diferentes fases de tecido ósseo neoformado em ratos diabéticos que receberam implantes de hidroxiapatita na tíbia. Foram utilizados como fluorocromos a calceína, a

alizarina e a oxitetraciclina e a visualização dos cortes foi feita em microscópio confocal, utilizando filtros para fluoresceína (FITC) ou rodamina (TRITC).

Lee e cols (2003)[18] utilizaram também fluorocromos no processo de reparação, quantificando microlesões com a mensuração de massa óssea. Foram utilizados como fluorocromos oxitetraciclina, alizarina, calceína e xilenol.

Tiling e cols (2004)[19] demonstraram, em experimentos feitos em roedores infectados com Streptococcus pneumoniae tipo 3, o local e tempo em que ocorre o início da deposição óssea, através da injeção de fluorocromos – calceína, xilenol, oxitetraciclina e alizarina.

Em razão da série de pesquisas realizadas em osseointegração utilizando a injeção de fluorocromos, demonstrando a importância da dinâmica do processo de reparo ósseo, torna-se oportuna a realização deste trabalho.

Proposição

2 Proposição

Este trabalho tem como propósito avaliar o processo de reparo em alvéolos dentários isquêmicos e não-infectados de ratos, após a aplicação de uma pasta à base de metronidazol a 10%, lidocaína a 2%, lanolina como veículo e menta como aromatizante, utilizando a injeção de fluorocromos.

Material e Método

3 Material e Método

Após a aprovação obtida junto á Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus Araçatuba, foram utilizados, neste experimento, 60 ratos *(Rattus norevegicus albicans*, Wistar) machos, com idade variando entre 70 a 90 dias, pesando aproximadamente 250 a 300 gramas.

Procedentes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, os animais foram transportados ao Biotério do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada e mantidos em gaiolas comuns, contendo cinco animais cada. Os animais apresentavam-se, clinicamente, livres de qualquer entidade patológica.

Antes e durante a fase experimental, os animais receberam ração sólida (Ração Ativada Produtor-Anderson & Clayton S. A.), com exceção das primeiras 24 horas pós-cirurgia, na qual essa ração foi triturada. Durante todo o período experimental todos os animais receberam água à vontade.

Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Quetamina (Vetaset - Fort Dodge) e Xilazina (Coopazine – Coopers Brasil Ltda), mediante injeção intramuscular, na dosagem de 0,2 e 0,1 ml para cada 250 gramas de peso corpóreo, respectivamente. Após anti-sepsia da área cirúrgica com Dermoidine (Gessy Lever Indústria Farmacêutica Ltda.), o

incisivo superior direito de cada animal foi extraído de acordo com a técnica descrita por Okamoto & Russo (1973).[2]

A partir daí, três grupos experimentais foram constituídos, com 20 ratos em cada um, ou seja:

Grupo I: reparação normal;

Grupo II: isquemia provocada pela inserção de cone de papel absorvente embebido em solução de adrenalina 1:1000, por um minuto; e preenchimento do alvéolo com a pasta à base de metronidazol a 10% (Flagyl, Rhodia Pharma S. A.), lidocaína a 2% (Merrel-Lepetit, Indústrias Farmacêuticas Ltda), lanolina (Purifarma – Distribuidora Química e Farmcêutica Ltda) como veículo e menta (Botica Ao Veado D'ouro) como aromatizante;

Grupo III: o alvéolo foi preenchido com a pasta à base de metronidazol a 10% (Flagyl, Rhodia Pharma S. A.) e lidocaína a 2% (Merrel-Lepetit, Indústrias Farmacêuticas Ltda), utilizando lanolina (Purifarma – Distribuidora Química e Farmacêutica Ltda.) como veículo e menta (Botica Ao Veado D'ouro) como aromatizante.

Essa pasta foi introduzida no interior do alvéolo com o auxílio de seringa Luer plástica descartável (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda), com agulhas previamente preparadas para a melhor adaptação ao formato alveolar.

As bordas dos alvéolos de todos os animais foram coaptadas por meio de sutura com fio de seda 4.0 (Ethicon), com o objetivo de evitar o deslocamento do coágulo (Grupo I) e da pasta empregada (Grupos II e

III).

Após seis dias foram iniciadas as injeções dos fluorocromos (20mg/Kg de peso corporal) em 15 ratos (5 animais de cada grupo), por via intramuscular, para posterior análise em microscopia de fluorescência das camadas de tecido ósseo. Aos 6 dias foi injetada a calceína (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA), aos 15 dias a alizarina (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) e aos 21 dias a oxitetraciclina (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA). Após 35 dias esses animais foram sacrificados por injeção excessiva de anestésico.

A eutanásia dos 45 animais restantes, divididos em 15 ratos por grupo, foi realizada nos períodos de 6, 15 e 21 dias após as extrações, também por injeção excessiva de anestésico. Estas peças seguiram o procedimento convencional para coloração com hematoxilina-eosina, sendo analisadas no microscópio óptico binocular JENAMED 2 (Carl-Zeis), com objetiva de aumento 63X.

Os cortes obtidos dos animais em que foram injetados os fluorocromos foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos - Dinâmica). Após a fixação, as peças passaram pela etapa de desidratação a partir da seqüência crescente de álcoois (70, 80, 90 e 100), com troca de solução a cada 3 dias, sendo agitadas (Agitador orbital, Kline CT-150, Cientec – equipamentos para laboratório) todos os dias, durante 4 horas.

Ao término da desidratação as peças foram imersas em acetona (Synth) por 24 horas e, na seqüência, iniciaram-se os banhos em

monômero metil metacrilato (JET - Artigos Odontológicos Clássico Ltda, Indústria Brasileira), sendo que o primeiro e o segundo banhos tiveram a duração de 24 horas cada. Para a realização do terceiro banho, foi acrescentado ao monômero um catalizador, no caso, o peróxido de benzoila (Riedel – De Haën AG, Seelze – Hannover) na concentração de 1%.

Em seguida, as peças foram colocadas individualmente em tubos de ensaio com tampa e permaneceram imersas neste terceiro banho até que o monômero polimerizasse. Este processo durou aproximadamente 72 horas à temperatura ambiente.

Após a polimerização, os blocos com as peças foram desgastados em esmeril. Em seguida, estes cortes chegaram a espessura de 100µm, através do desgaste manual em lixas d'água (3M).

Obtidos os cortes, estes foram colocados em lâmina de vidro e as lamínulas foram montadas utilizando o nujol (Schering- Plough) como meio de montagem. Após a fixação das lamínulas, as bordas foram isoladas com esmalte cosmético para evitar o ressecamento dos cortes.

Para análise qualitativa foi utilizado um microscópio de epifluorescência (Axiophot, Carl Zeiss, Oberkohen, Germany), com filtros específicos para cada fluorocromo, ou seja, filtro com fotomultiplicador no valor de 488 para a calceína, 594 para a alizarina e luz ultavioleta com fotomultiplicador no valor de 368 para a oxitetraciclina, correspondentes ao comprimento de onda excitado por cada fluorocromo.

Para aquisição das imagens utilizou-se uma câmera digital acoplada a um microscópio de fluorescência e conectada ao computador. Para padronização da análise capturou-se a região de terço médio de todos os alvéolos.

Para ilustração da dinâmica do processo de reparo alveolar foi realizada a sobreposição das imagens obtidas a partir de cada fluorocromo utilizado. Para a sobreposição das imagens foi utilizado o aplicativo Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems Incorporated). Os passos foram os seguintes: (1) ferramenta “arquivo” e abertura de uma nova imagem com fundo transparente, 150dpis de resolução e tamanho 22,01 X 17,2cm, respeitando os dados originais das imagens previamente capturadas; (2) ferramenta “arquivo” e abertura das 3 imagens originais; (3) ferramenta “mover” para selecionar e arrastar a imagem da oxitetracilcina para o novo arquivo; (4) ferramenta “mover” para selecionar e arrastar a imagem da alizarina para sobrepô-la a imagem da oxitetraciclina; (5) utilizaçâo da ferramenta “varinha mágica” com tolerância 10 e suavização de serrilhado para selecionar as áreas da imagem não coradas pelo fluorocromo alizarina; (6) ferramenta “delete” para eliminação da área selecionada; (7) ferramenta “mover” para selecionar e arrastar a imagem da calceína para sobrepô-la às outras duas imagens; (7) utilização da ferramenta “varinha mágica” para selecionar as áreas da imagem não corados pelo fluorocromo calceína; (8) ferramenta “delete” para a eliminação da área selecionada e obtenção da imagem sobreposta.

Resultado

4 Resultado

Para a descrição dos resultados foi realizada uma análise qualitativa dos períodos pós-operatórios, considerando-se as ocorrências verificada no terço médio do alvéolo dental.

A exposição dos achados aponta a dinâmica do processo de reparo alveolar, através das marcações com fluorocromos, que apresentam-se como faixas representativas do tecido ósseo formado no dia da injeção, e os fenômenos histológicos encontrados, através da coloração com hematoxilina-eosina.

Grupo I – Controle - 6 dias

Calceína

O osso neoformado é representado pela calceína, visualizada na cor verde. Observa-se marcação predominante deste fluorocromo junto à parede lingual, mostrando que houve formação de tecido ósseo na região do terço analisado (Figura 1).

Hematoxilina-eosina

O tecido conjuntivo mostra-se organizado com nítida proliferação de vasos sangüíneos em torno de uma área central ainda ocupada por coágulo. A organização do tecido já permite observar, em pequeno número, delgadas trabéculas ósseas neoformadas nas proximidades das paredes alveolares (Figura 2).

Grupo I – Controle - 15 dias

Alizarina

A injeção de alizarina promoveu a marcação em vermelho do tecido ósseo formado. Observa-se que esta marcação apresenta-se ocupando grande parte do terço médio do alvéolo, evidenciando a quantidade de tecido ósseo formado neste período (Figura 3).

Hematoxilina-eosina

O tecido conjuntivo mostra-se bastante organizado com menor quantidade de vasos sangüíneos. As trabéculas ósseas apresentam-se ainda delgadas, porém em grande quantidade, principalmente a partir da parede lingual, e já se encaminham para a área central do alvéolo (Figura 4).

Grupo I – Controle -21 dias

Oxitetraciclina

A injeção de oxitetraciclina possibilita observar o tecido ósseo marcado em azul (Figura 5). Observa-se uma menor quantidade de tecido ósseo formado neste período, quando comparado à marcação da alizarina no período de 15 dias.

Hematoxilina-eosina

O tecido conjuntivo mostra-se bastante organizado com menor quantidade de vasos sangüíneos. As trabéculas ósseas neoformadas apresentam-se espessas e em grande quantidade, já com espaços medulares definidos, ocupando quase toda a superfície do terço

analisado, inclusive a porção central do alvéolo (Figura 6).

Grupo I – Sobreposição de imagens

A sobreposição das imagens possibilita evidenciar o tecido ósseo formado em cada período, portanto, é possível observar a predominância da calceína (6 dias) junto à parede lingual, bem como a grande quantidade de marcação da alizarina (15 dias) em todo o terço médio analisado e a presença de marcação da oxitetraciclina (21 dias) em menor quantidade que a alizarina, mostrando que neste último período houve menor taxa de neoformação óssea (Figura 7).

Grupo II – Isquemia e pasta - 6 dias

Calceína

O osso neoformado representado pela calceína (coloração verde) é observado, predominantemente, na parede vestibular do alvéolo e, discretamente, na parede lingual (Figura 8).

Hematoxilina-eosina

O tecido conjuntivo mostra-se organizado com grande quantidade de vasos sangüíneos ocupando toda a extensão do terço analisado. Observam-se delgadas trabéculas ósseas neoformadas em número bastante discreto (Figura 9).

Grupo II - Isquemia e pasta - 15 dias

Alizarina

A injeção de alizarina, representada pela marcação em vermelho do tecido ósseo neoformado, apresenta-se ocupando grande parte do terço médio do alvéolo, evidenciando a quantidade de tecido ósseo formado neste período (Figura 10).

Hematoxilina-eosina

O tecido conjuntivo mostra-se bastante organizado com grande quantidade de vasos sangüíneos. As trabéculas ósseas neoformadas apresentam-se ainda delgadas, porém em grande quantidade e já se encaminham para a área central do alvéolo (Figura 11).

Grupo II - Isquemia e pasta - 21dias

Oxitetraciclina

A injeção de oxitetraciclina, representada em azul (Figura 12), mostra uma quantidade de tecido ósseo neoformado semelhante ao período representado pela marcação com a alizarina (15 dias).

Hematoxilina-eosina

O tecido conjuntivo, apesar de organizado, mostra ainda grande quantidade de vasos sangüíneos. As trabéculas ósseas neoformadas apresentam-se ainda delgadas e em grande quantidade, ocupando principalmente as proximidades da parede lingual do alvéolo e em direção a área central. Os espaços medulares ainda não estão definidos (Figura 13).

Grupo II – Sobreposição de imagens

A sobreposição das imagens, possibilita evidenciar a taxa de mineralização óssea deste grupo em cada período, mostrando que há uma predominância da calceína (6 dias) na parede vestibular do alvéolo, como também uma quantidade semelhante de tecido ósseo neoformado marcado por alizarina (15 dias) e oxitetraciclina (21 dias) (Figura 14).

Grupo III – Pasta - 6 dias

Calceína

A injeção da calceína, representada em verde, mostra a predominância da marcação na parede vestibular e lingual do alvéolo, mostrando que houve formação de tecido ósseo na região do terço analisado (Figura 15).

Hematoxilina-eosina

O tecido conjuntivo mostra-se organizado com nítida proliferação de vasos sangüíneos em torno de uma área central ainda ocupada por coágulo. Delgadas trabéculas ósseas neoformadas, nas proximidades da parede lingual do alvéolo, podem ser observadas em quantidade muito pequena (Figura 16).

Grupo III - Pasta - 15 dias

Alizarina

O osso neoformado, possibilita observar tecido ósseo marcado em vermelho. Observa-se que esta marcação apresenta-se ocupando parte do terço médio do alvéolo, a partir da parede lingual e vestibular deste,

evidenciando a quantidade de tecido ósseo formado neste período (Figura 17).

Hematoxilina-eosina

O tecido conjuntivo mostra-se organizado com grande quantidade de vasos sangüíneos. As trabéculas ósseas neoformadas apresentam-se ainda delgadas, porém em grande quantidade, principalmente a partir da parede lingual, e já se encaminham para a área central do alvéolo, ocupando grande porção do terço analisado (Figura 18).

Grupo III - Pasta - 21 dias

Oxitetraciclina

A injeção de oxitetraciclina, representada pela cor azul (Figura 19), permite observar quantidade de tecido ósseo neoformado semelhante a marcação com a alizarina (15 dias).

Hematoxilina-eosina

O tecido conjuntivo mostra-se bastante organizado com menor quantidade de vasos sangüíneos. As trabéculas ósseas neoformadas apresentam-se ainda delgadas e em grande quantidade, ocupando quase toda a superfície do terço analisado, inclusive a porção central do alvéolo. Os espaços medulares, porém, ainda não estão bem definidos (Figura 20).

Grupo III – Sobreposição de imagens

A sobreposição das imagens, mostra a quantidade de tecido ósseo

neoformado em cada período em que foi injetado o fluorocromo. Assim, observa-se predominância da marcação com calceína (6 dias) na parede vestibular e lingual do alvéolo, bem como uma quantidade semelhante de tecido ósseo neoformado marcado por alizarina (15 dias) e oxitetraciclina (21 dias) (Figura 21).

Discussão

5 Discussão

Qualquer material, por mais biocompatível que seja, quando colocado no interior do alvéolo logo após a extração dentária, provoca, invariavelmente, um atraso no processo de reparação alveolar. Dessa forma, o melhor preenchimento da ferida após a extração é mesmo o coágulo sangüíneo. Essa afirmativa, porém, permite ainda alguma discussão, de tal sorte que alguns trabalhos defendem a aplicação de algum composto objetivando a prevenção de complicações pós-exodônticas,[20-24] ao mesmo tempo em que a sua condenação também pode ser observada.[25]

A atitude supostamente preventiva, ou seja, o uso indiscriminado de materiais para a proteção do alvéolo cruento não deve ser difundido entre os clínicos, principalmente entre aqueles que trabalham em pequenos centros com ambientes não ideais para a prática de intervenções cirúrgicas. No entanto, diante daqueles casos que apresentam alguns fatores predisponentes que possam favorecer a instalação das alveolites, essas medidas podem estar indicadas.

Essas complicações pós-operatórias, particularmente as alveolites, ainda despertam grande interesse dos pesquisadores,[26] originando vários estudos,[20,22,23,27-33] sempre em busca de um composto que seja capaz de aliviar a dor e, ao mesmo tempo, que exerça pouca influência sobre a cronologia normal de reparação alveolar.

O uso da pasta constituída por metronidazol a 10%, lidocaína a 2%,

lanolina como veículo e menta como aromatizante, parece justificado em razão dos bons resultados histológicos encontrados quando da sua utilização em alvéolos dentais de ratos,[10] além de ter um veículo referendado por pesquisa.[34] Quanto ao outro componente da pasta, a lidocaína, também existem estudos com a sua utilização tópica em substituição à anestesia infiltrativa,[26,35,36] e que avaliam a sua biocompatibilidade quando em contato com tecido conjuntivo subcutâneo de ratos.[12].

As informações obtidas pela marcação dos fluorocromos no grupo tratado com a pasta, mostram a predominância dos marcadores alizarina e oxitetraciclina, confirmando-se que os períodos de maior deposição óssea estão na 2ª e 3ª semanas, fato semelhante aos achados histológicos, em que podem ser observadas grandes quantidades de trabéculas ósseas, porém ainda delgadas. A quantidade pequena de calceína demonstrou que no período de 6 dias houve maior reabsorção que aposição óssea, sendo este fato comprovado histologicamente, uma vez que, as trabéculas ósseas apresentam-se ainda em pequeno número.

Analisando ainda os dados encontrados nesta pesquisa, observa-se que os achados histológicos do grupo controle, reparo normal, estão em concordância com os relatados em outros trabalhos sobre reparação alveolar em ratos.[2,10]

Com relação às informações adquiridas pela coloração com fluorocromos, no grupo controle, nota-se que o marcador alizarina produziu o resultado mais pronunciado, seguido pela calceína e

oxitetracilcina. Pela análise qualitativa confirmou-se que o período de maior deposição óssea iniciou-se na 2ª semana. Em contrapartida, o depósito pequeno de calceína e oxitetraciclina, levou a conclusão de que uma pequena deposição ocorreu no início (6 dias) e fim (21 dias) do estudo. Este fato é confirmado pelos dados histológicos, uma vez que o período de 15 dias é o que apresenta maior substituição de tecido conjuntivo por tecido ósseo.

A isquemia provocada pela inserção de cone de papel absorvente embebido em adrenalina 1:1000, por um minuto, foi capaz de provocar um atraso na cronologia de reparação notado, principalmente, quando analisados os cortes histológicos aos 21 dias. Quando analisados os cortes corados pelos fluorocromos, ainda no grupo isquemia e pasta, observa-se predominância dos marcadores alizarina e oxitetraciclina, seguida da calceína, o que caracteriza osso imaturo ainda no fim do estudo.

Muito embora, em nenhum dos espécimes observados, tenha sido detectada a presença de complicações pós-exodônticas, vale lembrar que, a isquemia produzida pela mesma técnica sem, contudo, a posterior proteção das paredes alveolares, foi capaz de provocar alveolite experimental em ratos.[10,11] Esse achado levanta a hipótese de que, mesmo diante da deficiência de irrigação sangüínea, a pasta foi capaz de prevenir a instalação da patologia, provocando, apenas, um atraso no reparo sem provocar reação inflamatória severa. Atraso esse esperado em razão da presença do material no interior da loja cirúrgica e da isquemia previamente provocada.

Essa situação experimental com isquemia prévia pode ser transferida para a prática clínica e ilustrada por uma condição na qual se constata a presença de insuficiente suprimento sangüíneo no alvéolo, um dos fatores etiológicos relatados por BIRN, 1973.[5] Esse exemplo, aliado àqueles com a presença dos demais fatores etiológicos e/ou predisponentes, teria a indicação precisa para o preenchimento do alvéolo comprometido com uma pasta protetora, no caso em questão a composta por metronidazol a 10% e lidocaína a 2%. Essa iniciativa promove conforto pós-operatório ao paciente, tranqüilidade ao cirurgião e não provoca danos significativos à cronologia da reparação alveolar, comprovada pela análise em microscopia óptica e de fluorescência.

Conclusão

6 Conclusão

A pasta constituída por metronidazol a 10%, lidocaína a 2%, lanolina como veículo e menta como aromatizante pode ser utilizada nos alvéolos com insuficiente suprimento sangüíneo.

Referências

7 Referências

1 Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. J Am Dent Assoc, 1960; 61:32-44.

2 Okamoto T, Russo MC. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. Rev Fac Odontol Araçatuba, 1973;2:153-64.

3 Birn H. Bacteria and fibrinolytic activity in “dry socket”. Acta Odontol Scand, 1970; 28:773-83.

4 Birn H. Fibrinolytic activity of alveolar bone in “dry socket”. Acta Odontol Scand, 1972; 30:23-32.

5 Birn H. Etiology and pathogenesis of fibrinolytic alveolitis (“dry socket”). Int J Oral Surg, 1973; 2:211-63.

6 Garcia AG, Grana PM, Sampedro FG, Diago MP, Rey JM. Does oral contraceptive use affect the incidence of complications after extraction of a mandibular third molar? Br Dent J, 2003;194:453-5.

7 Al-Belasy FA. The relationship of "shisha" (water pipe) smoking to postextraction dry socket. J Oral Maxillofac Surg, 2004;62:10-4.

8 Mitchell DA. Metronidazole: its use in clinical dentistry. J Clin Periodontol, 1984;11:145-58.

9 Mitchell L. Topical metronidazole in the treatment of “dry socket”. Br Dent J, 1984; 56:132-4.

10 Poi WR, Carvalho PSP, Okamoto T, Andrade ED, Panzarini SR. Influência da pasta à base de metronidazol a 10 por cento e lidocaína a 2 por cento sobre o processo de reparo em alvéolo dental infectado: análise histológica e histométrica em ratos. Rev Odontol UNESP, 1998; 27:53-72.

11 Poi WR, Carvalho PSP, Panzarini SR, Dezan Júnior E, Trevisan CL, Souza, G. Estudo da pasta de metronidazol, lidocaína e ascorbosilane C sobre o processo de reparo de alvéolos dentais infectados em ratos BCI, 2000; 7:22-8.

1. As referências no texto estão de acordo com as normas da revista Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology, para a qual o trabalho será enviado.

12 Poi WR, Carvalho PSP, Andrade ED. Nova pasta para o tratamento da alveolite: estudo histológico do comportamento do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos ao implante de uma pasta à base de metronidazol a 10 por cento e lidocaína a 2 por cento. RGO (Porto Alegre), 1999; 47:102-4.

13 Bendesky A, Menendez D, Ostrosky-Wegman P. Is metronidazole carcinogenic? Mutat Res, 2002; 511:133-44.

14 Griffiths GS, Smart GJ, Bulman JS, Weiss G, Shrowder J, Newman NH. Comparison of clinical outcomes following treatment of chronic adult periodontitis with subgingival scaling or subgingival scaling plus metronidazole gel. J Clin Periodontol, 2000; 27:910-7.

15 Varshosaz J, Tavakoli N, Saidian S. Development and physical characterization of a periodontal bioadhesive gel of metronidazole. Drug Deliv, 2002; 9:127-33.

16 Stelzel M, Flores-de-Jacoby L. Topical metronidazole application as an adjunct to scaling and root planing. J Clin Periodontol, 2000; 27: 447-52.

17 Iyama S, Takeshita F, Ayukawa Y, Kido MA, Suetsugu T, Tanaka T. A study of the regional distribution of bone formed around hidroxyapatite implants in the tibiae of streptozotocin-induced diabetic rats using mutiple fluorescent labeling and cofocal laser scanning microscopy. J Periodontal, 1997; 68:1169-75.

18 Lee TC, Mohsin S, Taylor D, Parkesh R, Gunnlaugsson T, O'Brien FJ, Giehe M, Gowin W. Detecting microdamage in bone. J Anatomy, 2003; 203:161-72.

19 Tinling SP, Colton J, Brodie HA. Location and timing of initial osteid deposition in postmeningitec labyrinthitis ossificans determined by multiple fluorescent label. Laryngoscope, 2004; 114:675-80.

20 Bloomer CR. Alveolar osteitis prevention by immediate placement of medicated packing. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2000; 90:282-4.

21 Vezeau PJ. Dental extraction wound management: medicating postextraction sockets. J Oral Maxillofal Surg, 2000;58:531-7.

22 Poor MR, Hall JE, Poor AS. Reduction in the incidence of alveolar osteitis in

patients treated with the SaliCept patch, containing Acemannan hydrogel. J Oral Maxillofac Surg, 2002; 60:374-9.

23 Oginni FO, Fatusi OA, Alagbe AO. A clinical evaluation of dry socket in a nigerian teaching hospital. J Oral Maxillofac Surg 2003; 61:871-6.

24 Sanchis JM, Saez U, Penarrocha M, Gay C. Tetracycline compound placement to prevent dry socket: a postoperative study of 200 impacted mandibular third molars. J Oral Maxillofac Surg 2004; 62:587-91.

25 Alexander RE. Dental extraction wound management: a case against medicating postextraction sockets. J Oral Maxillofac Surg, 2000; 58:538-51.

26 Betts NJ, Makowski G, Shen YH, Hersh EY. Evaluation of topical viscous 2% lidocaine jelly as an adjunct during the management of alveolar osteitis. J Oral Maxillofac Surg, 1995; 53:1140-4.

27 Jaafar N, Nor GM. The prevalence of post-extraction complications in an outpatient dental clinic in Kuala Lumpur Malaysia-a retrospective survey. Singapore Dent J 2000; 23:24-8.

28 Melo Junior EJ de, Raposo MJ, Lisboa Neto JÁ, Diniz MF, Marcelino Júnior AC, Sant'Ana AE . Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: microbiological and microscopic analysis. Phytomedicine 2002; 9:109-16.

29 Yoshii T, Hamamoto Y, Muraoka S, Furudoi S, Komori T. Differences in postoperative morbidity rates, including infection and dry socket, and differences in the healing process after mandibular third molar surgery in patients receiving 1-day or 3-day prophylaxis with lenampicillin. J Infect Chemother 2002;8:87-93.

30 Halberstein RA, Abrahmsohn GM. Clinical management and control of alveolalgia ("dry socket") with vitamin C. Am J Dent 2003;16:152-4.

31 Benediktsdottir IS, Wenzel A, Petersen JK, Hintze H. Mandibular third molar removal: risk indicators for extended operation time, postoperative pain, and complications. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004; 97:438-46.

32 Neugebauer J, Jozsa M, Kubler A. Antimicrobial photodynamic therapy for prevention of alveolar osteitis and post-extraction pain. Mund Kiefer

Gesichtschir, 2004; 8:350-5.

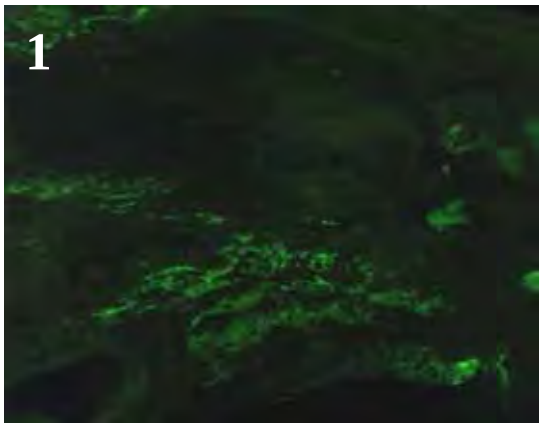
33 Poeschl PW, Eckel D, Poeschl E. Postoperative prophylactic antibiotic treatment in third molar surgery--a necessity? J Oral Maxillofac Surg 2004; 62:3-8.

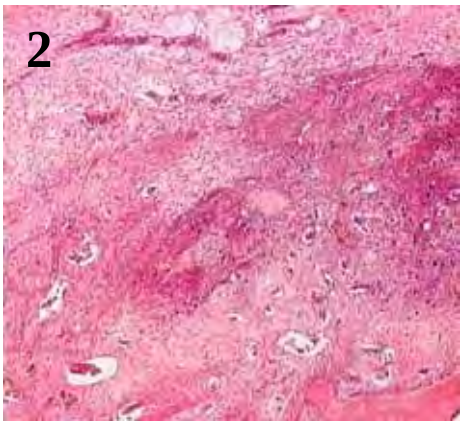
34 Fischmeister I, Hellgren L, Vincent J. Infrared spectroscopy for tracing of topically applied ointment vehicles and active substances on healthy skin. Arch Dermatol Res 1975; 253:63-9.

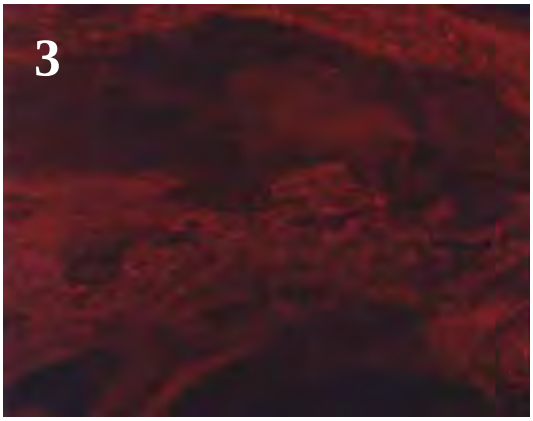
35 Jeffcoat MK, Geurs NC, Magnusson I, MacNeill SR, Mickels N, Roberts F, Robinson P, Salamati A, Yukna R. Intrapocket anesthesia for scaling and root planing: results of a double-blind multicenter trial using lidocaine prilocaine dental gel. J Periodontol 2001; 72:895-900.

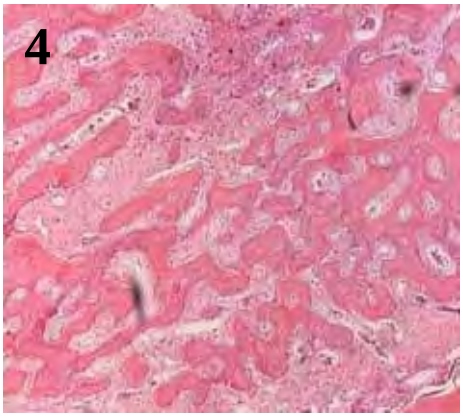
36 Friskopp J, Nilsson M, Isacsson G. The anesthetic onset and duration of a new lidocaine/prilocaine gel intra-pocket anesthetic (oraqix) for periodontal scaling/root planing. J Clin Periodontol 2001; 28:453-8.

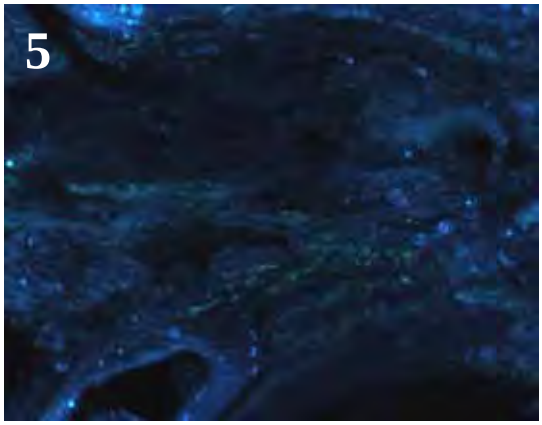
ILUSTRAÇÕES E LEGENDAS

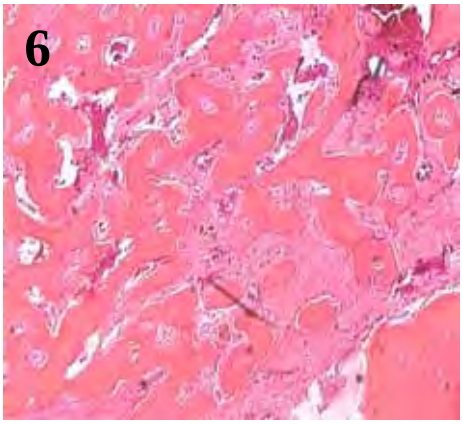


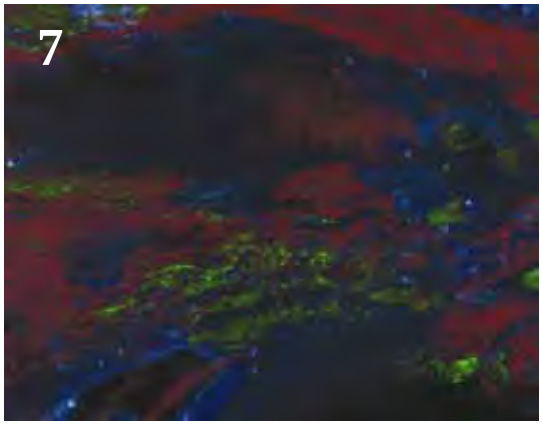






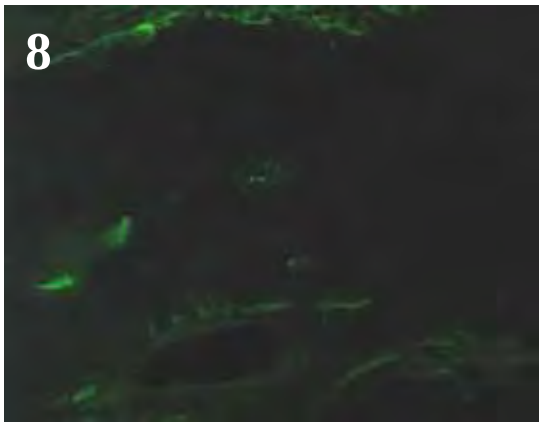


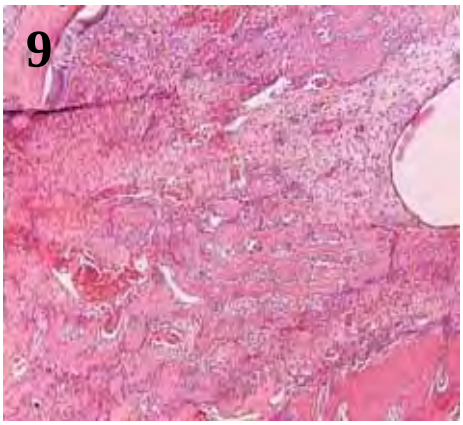


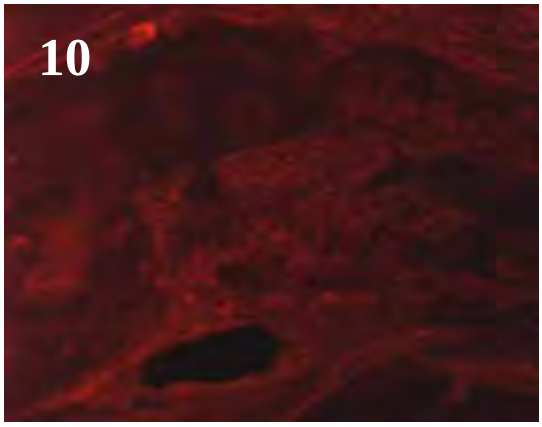


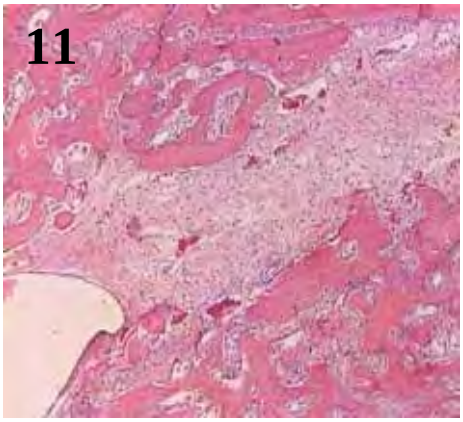
Grupo I - Controle

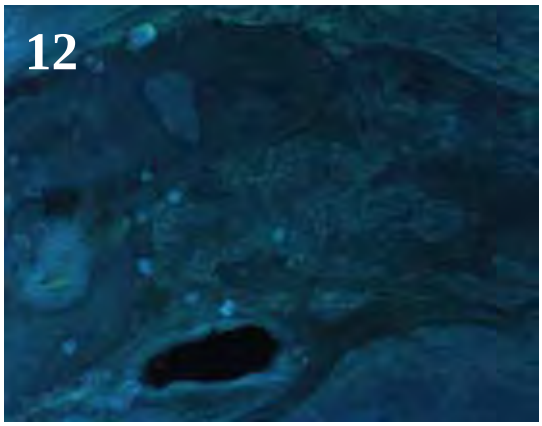
FIGURA 1 - Calceína, 6 dias;
FIGURA 2 - H. E., 6 dias;
FIGURA 3 - Alizarina, 15 dias;
FIGURA 4 - H. E., 15 dias;
FIGURA 5 - Oxitetraciclina, 21 dias;
FIGURA 6 - H. E., 21 dias;
FIGURA 7 - Sobreposição de 1, 3 e 5.

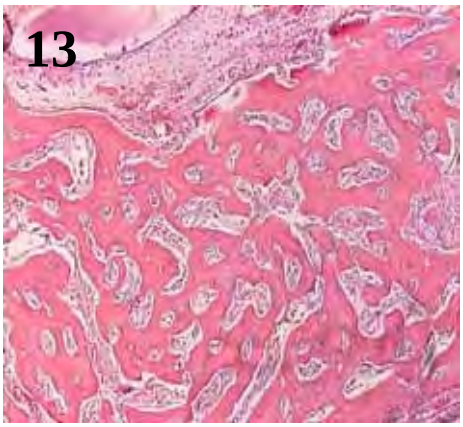


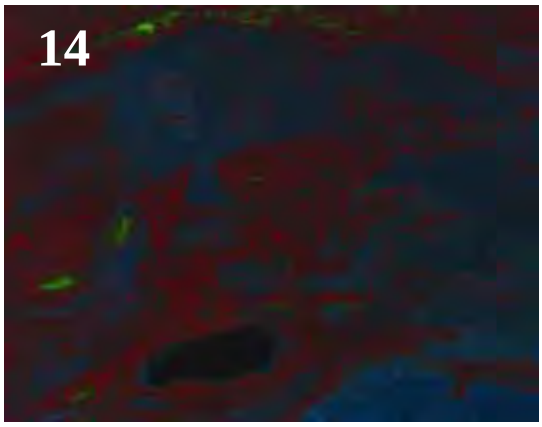






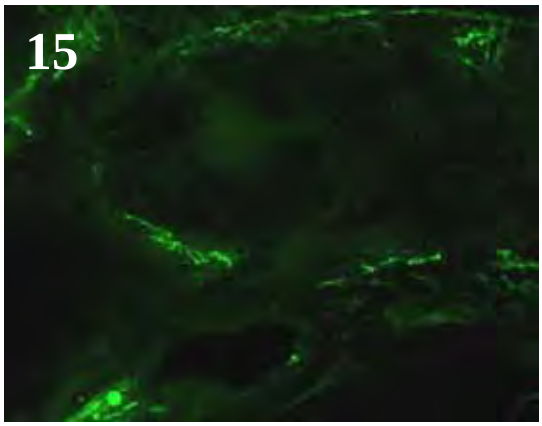


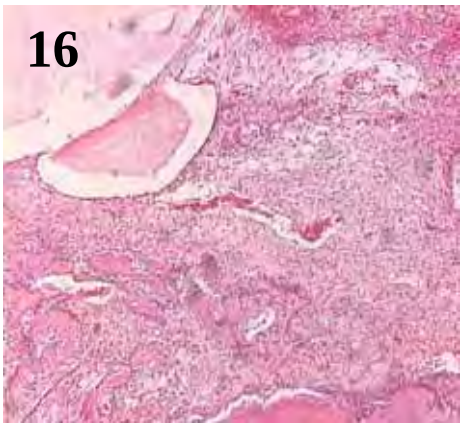


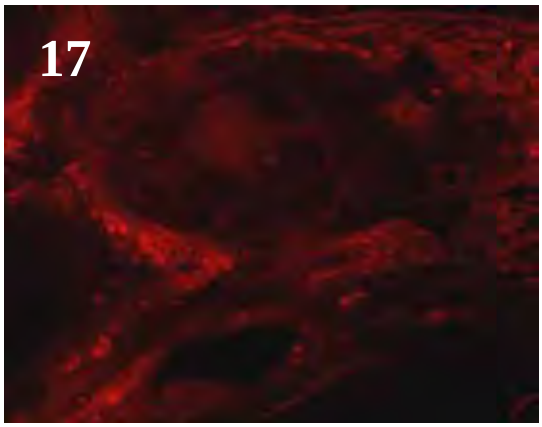


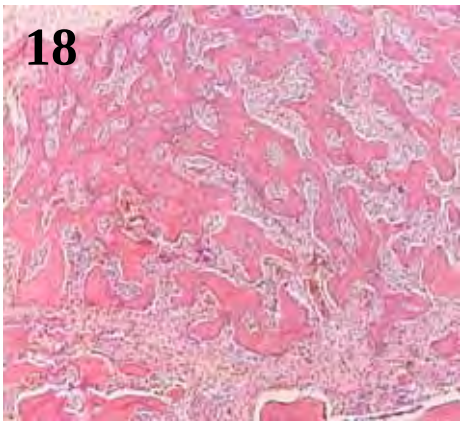
Grupo II - Isquemia e Pasta

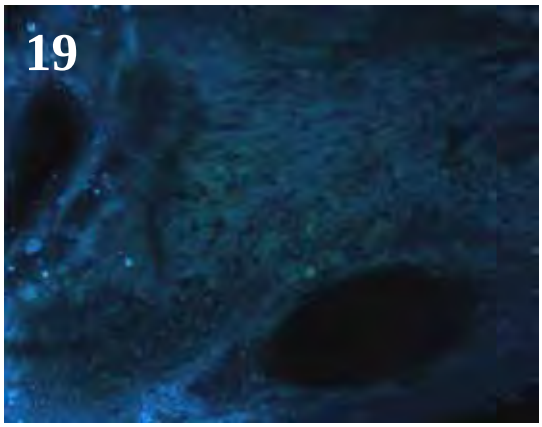
FIGURA 8 - Calceína, 6 dias;
FIGURA 9 - H. E., 6 dias;
FIGURA 10 - Alizarina, 15 dias;
FIGURA 11 - H. E., 15 dias;
FIGURA 12 - Tetraciclina, 21 dias;
FIGURA 13- H. E., 21 dias;
FIGURA 14 - Sobreposição de 8, 10 e 11.

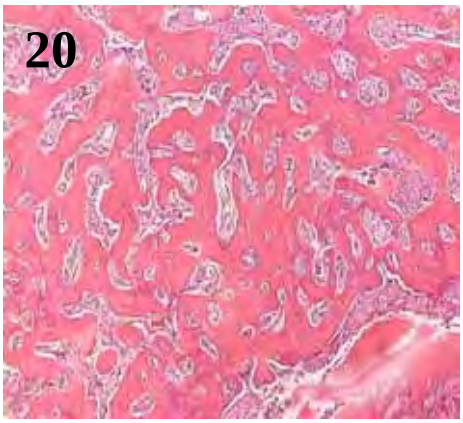


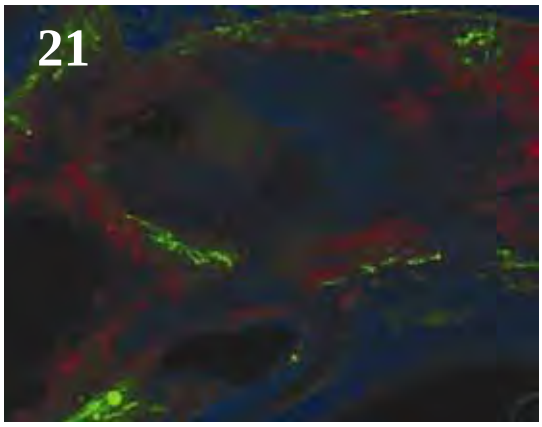










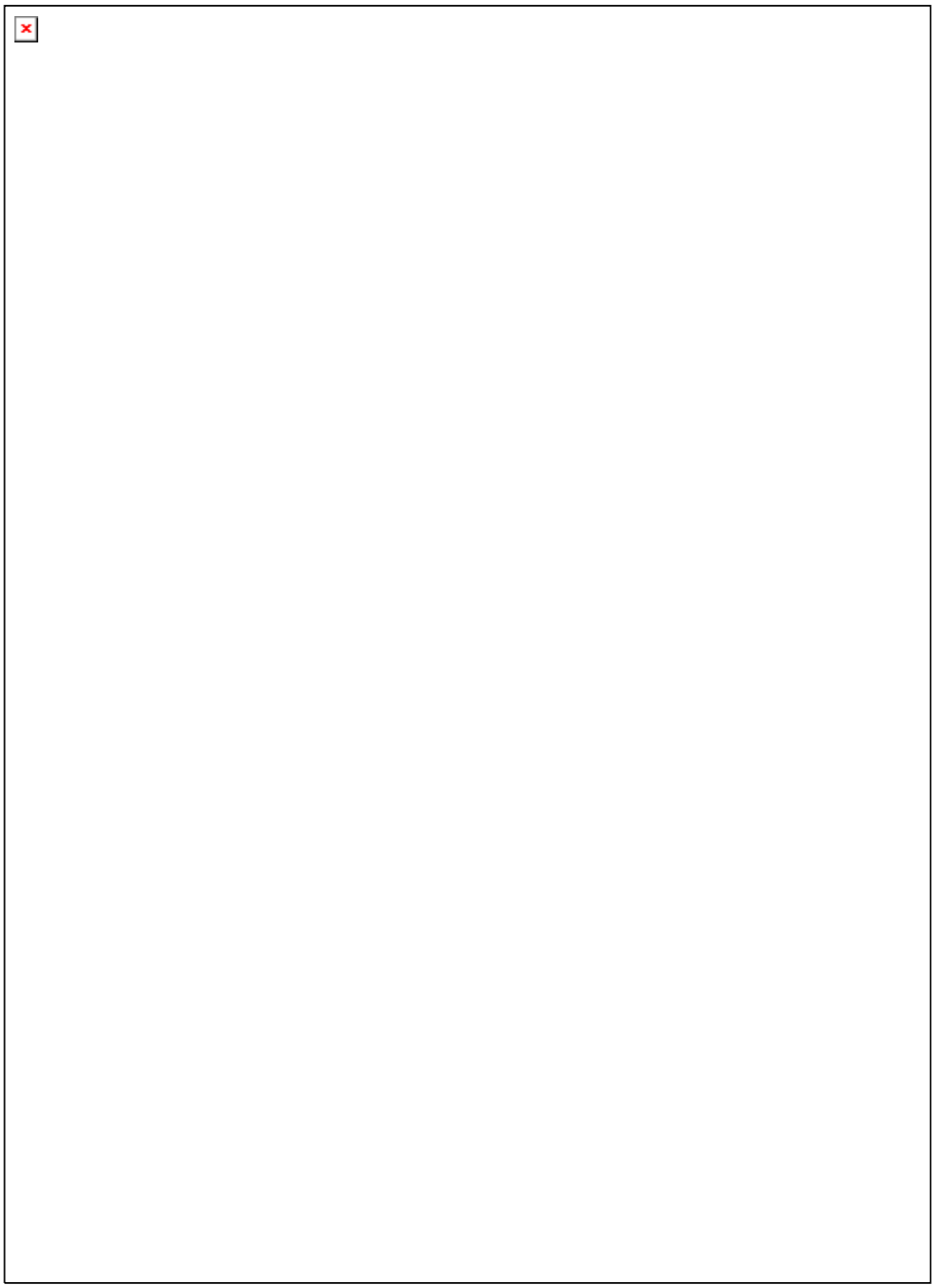


Grupo III - Pasta

FIGURA 15 - Calceína, 6 dias;
FIGURA 16 - H. E., 6 dias;
FIGURA 17 - Alizarina, 15 dias;
FIGURA 18 - H. E., 15 dias;
FIGURA 19 - Tetraciclina, 21 dias;
FIGURA 20 - H. E., 21 dias;
FIGURA 21 - Sobreposição de 15, 17 e 19.

Anexos

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA)



ANEXO B – Ilustrações da fase cirúrgica da metodologia experimental

FIGURA 1 – Anestesia.

FIGURA 2 – Sindesmotomia.

FIGURA 3 – Luxação.

FIGURA 4 – Extração.

FIGURA 5 –Cone de papel com adrenalina.

FIGURA 6 – Alvéolo após isquemia.

FIGURA 7 – Alvéolo com pasta.

FIGURA 8 – Sutura.

FIGURA 9 – Oxitetraciclina.

FIGURA 10 – Primeira fase da injeção.

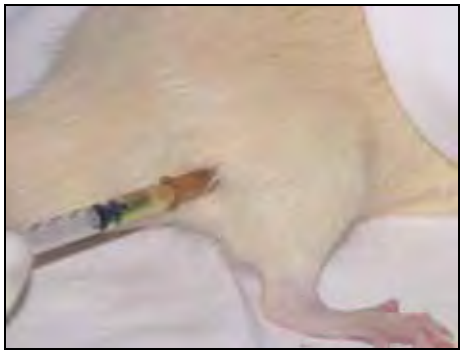


FIGURA 11 – Andamento da injeção.

FIGURA 12 – Final da injeção.

ANEXO C – Ilustrações da fase laboratorial da metodologia experimental

FIGURA 13 – Peça incluída.

FIGURA 14 – Calceína.

FIGURA 15 – Alizarina.

FIGURA 16 – Oxitetraciclina.

FIGURA 17 – Esmeril utilizado para o desgaste das peças.

ANEXO D – Ilustrações da seqüência utilizada para a sobreposição das imagens obtidas

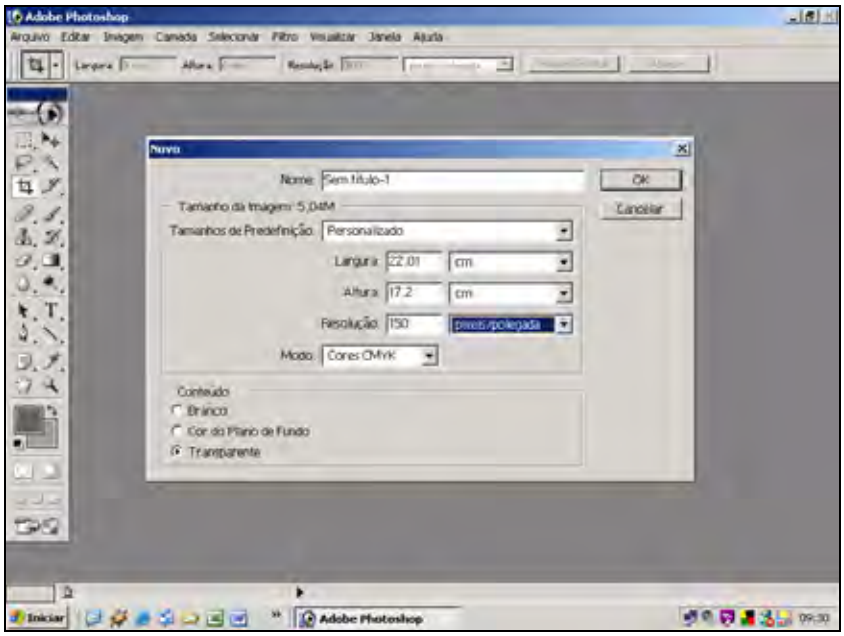


FIGURA 18 - Ferramenta “arquivo” e abertura de uma nova imagem com os dados originais das imagens previamente capturadas.

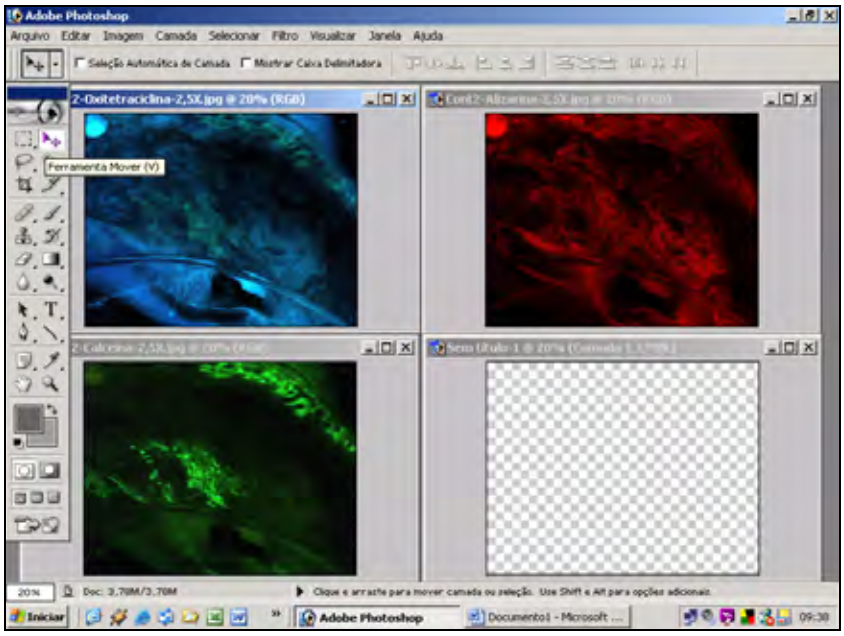


FIGURA 19 - Ferramenta “arquivo” e abertura das três imagens originais.

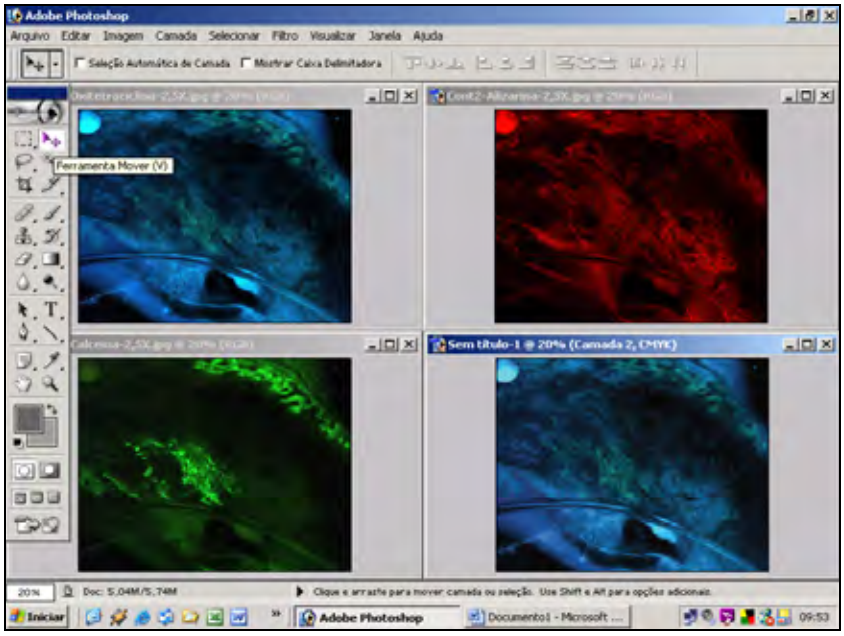


FIGURA 20 - Ferramenta “mover” para selecionar e arrastar a imagem da oxitetraciclina para o novo arquivo.

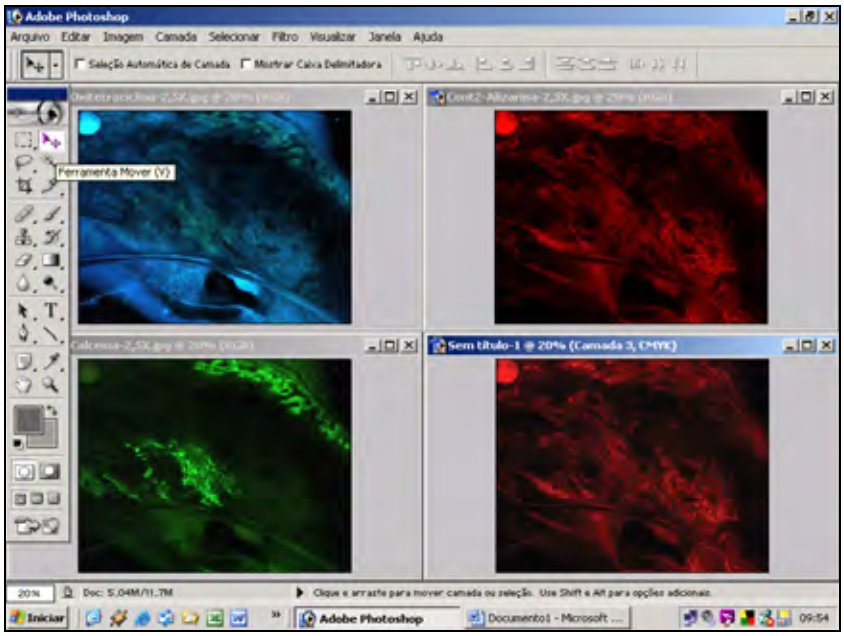


FIGURA 21 - Ferramenta “mover” para selecionar e arrastar a imagem da alizarina para sobrepô-la a imagem da oxitetraciclina.

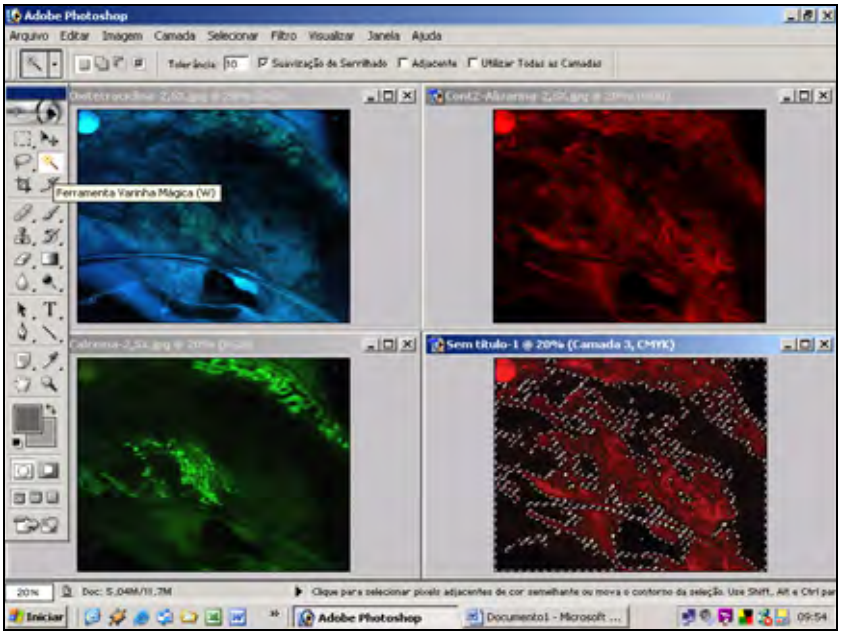


FIGURA 22 - Utilização da ferramenta “varinha mágica” para selecionar as áreas da imagem não coradas pelo fluorocromo alizarina.

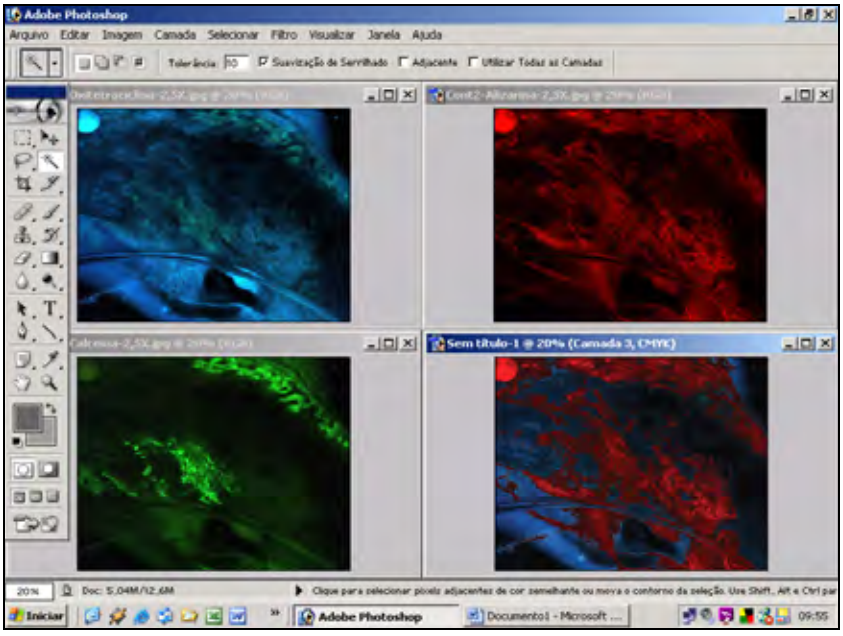


FIGURA 23 - Ferramenta “delete” para eliminação da área selecionada.

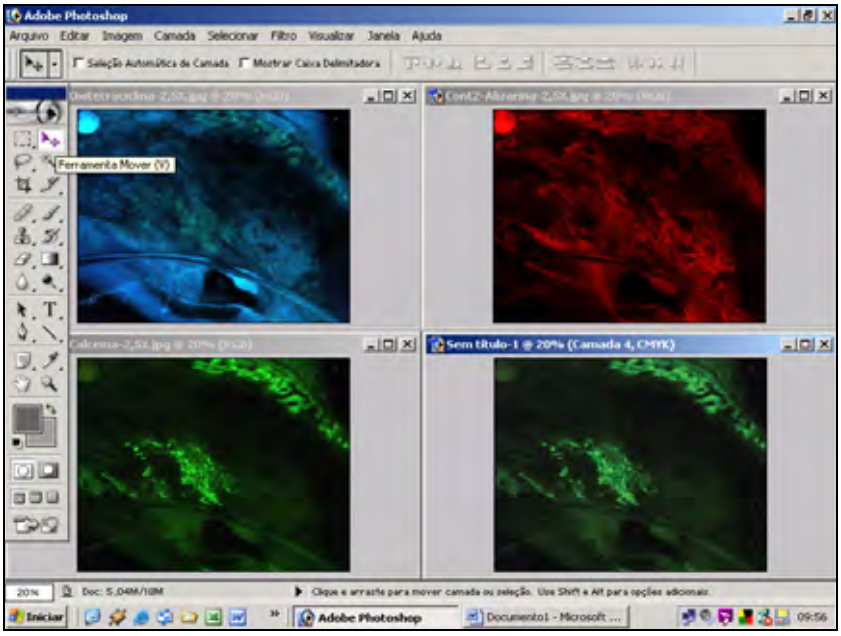


FIGURA 24 - Ferramenta “mover” para selecionar e arrastar a imagem da calceína para sobrepô-la às duas imagens.

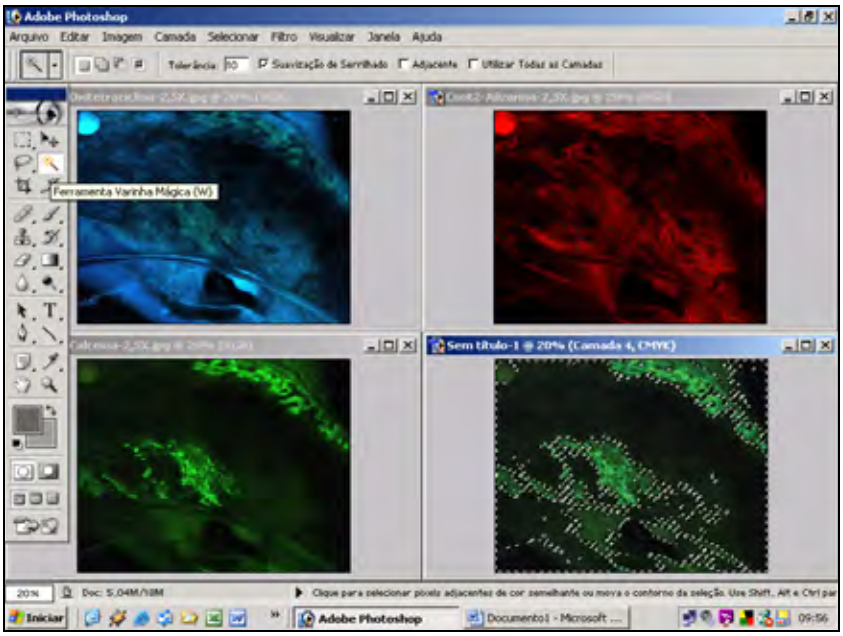


FIGURA 25 - Utilização da ferramenta “varinha mágica” para selecionar as áreas da imagem não coradas pelo fluorocromo calceína.

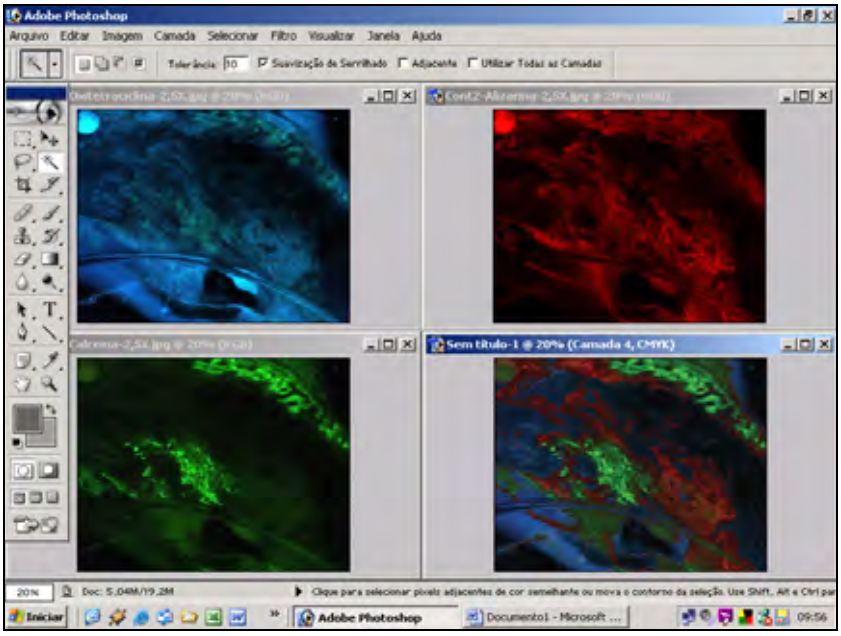


FIGURA 26 - Ferramenta “delete” para a eliminação da área selecionada e obtenção da imagem sobreposta.

Autorizo a reprodução deste trabalho.
Araçatuba, 12 de dezembro de 2005.

Thaís da Silveira Rodrigues