YURI SLUSARENKO DA SILVA

Análise histológica dos efeitos da solução de Carnoy em defeitos monocorticais realizados na mandíbula de ratos Wistar

São Paulo
2016

YURI SLUSARENKO DA SILVA

Análise histológica dos efeitos da solução de Carnoy em defeitos monocorticais realizados na mandíbula de ratos Wistar

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-graduação em **Ciências Odontológicas** para obter o título de Mestre em **Ciências.**

Área de Concentração: **Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais**

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Naclério-Homem.

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Silva, Yuri Slusarenko da.
Análise histológica dos efeitos da solução de Carnoy em defeitos monocorticais realizados na mandíbula de ratos Wistar / Yuri Slusarenko da Silva ; orientador Maria da Graça Naclério-Homem. -- São Paulo, 2016.
79 p. : fig., tab.; quadro; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão original

1. Solução de Carnoy. 2. Osteonecrose. 3. Tecido ósseo de animal. 4. Tumores odontogênicos. 5. Ratos Wistar. I. Naclério-Homem, Maria da Graça. II. Título.

Silva YS. Análise histológica dos efeitos da solução de Carnoy em defeitos monocorticais realizados na mandíbula de ratos Wistar. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

À Profa. Dra. **Maria da Graça Naclério-Homem**.
A ti dedico este trabalho. Sigamos avante com nossas pesquisas, em prol do exercício da Odontologia baseada em evidências.

A minha família, **Nádia**, **Natacha**, **Andrei** e **Valdemir**.
Obrigado por tudo. Mesmo com as intempéries da vida, mantivemo-nos em pé e olhando adiante. Também dedico esta conquista a vocês, em especial a minha mãe.

A **Thiaquelliny**, com amor.
Juntos somos mais fortes, sempre.

A **Adenita**, **Geraldo** e **Geraldo Filho**.
Obrigado por sempre me apoiarem e acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que com misericórdia e graça conduz-me às águas de descanso e faz-me repousar em pastos verdejantes.

A minha querida orientadora, Profa. Dra. Maria da Graça Naclério-Homem, que docilmente me acolheu, dando-me uma valiosa oportunidade para trilhar a carreira científica e, com sua sabedoria, sempre me ensinando mais e mais do universo acadêmico e da cirurgia odontológica em toda a sua amplitude.

Ao programa de Pós-graduação em Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais da FOUSP, palco para o desenvolvimento desta pesquisa e um celeiro de conhecimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

A Thiaquelliny, por todo apoio dado a esta pesquisa, desde a confecção do projeto até a finalização da dissertação.

Ao Prof. Dr. Ophir Ribeiro Júnior, Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chaves e à Profa. Dra. Luciana Corrêa pelo auxílio no delineamento e interpretação dos dados desta pesquisa.

A todos os professores da Disciplina de Cirurgia Odontológica e Buco-maxilo-facial da FOUSP, em especial, à Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni, pelo incentivo em minha trajetória na pós-graduação.

A todos os preceptores do programa de residência em Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais do Hospital Universitário da USP que a mim estenderam a mão para adentrar no universo cirúrgico.

Ao Dr. Aloísio e Andréia, Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da USP, por me auxiliarem com algumas etapas desta pesquisa.

A todos os amigos da pós-graduação, sem exceções, pelo convívio e alegrias compartilhadas. Um agradecimento especial a Elisangela Chinen, pelo auxílio no Laboratório de Biologia Oral.

Ao Prof. Luís Antônio Ferreira da Rocha (*in memorian*) que não privou a minha vontade de conquistar algo maior profissionalmente. Saudades!

A todos os meus amigos fora do ambiente de trabalho, por sempre compartilharem momentos felizes em minha vida.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Silva YS. Análise histológica dos efeitos da solução de Carnoy em defeitos monocorticais realizados na mandíbula de ratos Wistar [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Original.

A solução de Carnoy é rotineiramente empregada na prática clínica do cirurgião buco-maxilo-facial no tratamento coadjuvante de tumores odontogênicos benignos, por acreditar que ela possa provocar uma osteonecrose local e promover uma margem de segurança à cirurgia. O objetivo do presente trabalho foi verificar em um estudo *in vivo*, se a solução de Carnoy (substância teste) realmente causa osteonecrose e qual o seu impacto na reparação do tecido ósseo quando comparada com o soro fisiológico 0,9% (substância controle). Para isso, um defeito monocortical de 3 mm de diâmetro foi criado bilateralmente na superfície vestibular da mandíbula de 15 ratos Wistar sendo que, do lado direito foi realizada uma aplicação da solução de Carnoy por 5 minutos e do lado esquerdo, uma aplicação de soro fisiológico 0,9% por cinco minutos. Os animais foram igualmente subdivididos em três grupos para avaliar os efeitos da solução imediatamente, 3 e 10 dias após as aplicações, quando os espécimes foram coletados e preparados para as análises histológicas e estatísticas. Imediatamente e após 3 dias de sua aplicação, a substância teste não demonstrou provocar mais osteonecrose que a controle. No terceiro dia, ocorreu maior formação de coágulo sanguíneo dentro do defeito monocortical após a aplicação da substância controle; contudo, após 10 dias das aplicações, a quantidade de neoformação óssea não foi diferente entre elas. Concluímos que os efeitos da solução de Carnoy sobre o tecido ósseo devem ser questionados, mas seu poder fixativo das células tumorais não pode ser desprezado.

Palavras-chave: Solução de Carnoy. Osteonecrose. Tecido ósseo de animal. Tumores Odontogênicos. Ratos Wistar.

ABSTRACT

Silva YS. Histological analysis of Carnoy's solution effects on mandibular monocortical defects of Wistar rats [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Original.

Carnoy's solution is routinely used in clinical practice of oral and maxillofacial surgeons in the supplementary treatment of benign odontogenic tumors, given its capacity to cause local osteonecrosis, promoting a safety margin to the procedure. The aim of this study was to verify by an in vivo model, if Carnoy's solution (test) causes more osteonecrosis and what is it effect on bone healing when compared to saline solution 0,9% (control). For this, a monocortical defect was created bilaterally at vestibular aspect of 15 Wistar rats mandibles; right side received one 5 minutes Carnoy's solution application and left, one 5 minutes saline application. The animals were equally subdivided in three groups to investigate Carnoy's effect immediately, three and ten days after applications, when specimens were collected and prepared to histological and statistical analysis. Immediately and three days after its application, test substance did not show more osteonecrosis than control. At third day, it was observed more formation of blood clot inside monocortical defect for control; however, 10 days after applications, bone healing was not different between substances. We conclude that Carnoy's solution effects to bone tissue ought to be questioned but its capacity to fixate tumor cells may not be despised.

Keywords: Carnoy's solution. Osteonecrosis. Animal Osseous Tissue. Odontogenic Tumors. Wistar Rat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 – Ponta diamantada com formato discoide montada no contra-ângulo que realizará o defeito ósseo monocortical na mandíbula.....41

Figura 4.2 – Procedimento cirúrgico (Grupo A). Acesso cirúrgico (A), defeito ósseo monocortical (B), SC e SF antes das aplicações sobre o osso (C) e algodão embebido com 0,1 ml de solução de Carnoy e em contato com mesmo defeito demonstrado em B (D).....42

Figura 4.3 – Espécime removido do animal da Figura 4.2, imediatamente antes de sua fixação em formol.....43

Figura 4.4 – Vista superior de um espécime removido de um animal do grupo B. Uma porção do músculo masseter não foi removida para continuar revestindo o defeito monocortical e preservar o periósteo.....43

Figura 4.5 – Diagrama demonstrativo do preparo dos espécimes após sua coleta...45

Figura 4.6 – Corte histológico obtido de um rim de paciente humano corado com Azul da Prússia com contracoloração de Carmalumen de Mayer (magnificação 10x). Ele representa o controle da coloração das amostras que receberam as aplicações da solução de Carnoy e soro fisiológico 0,9%, indicando que não houve falhas no processo.....45

Figura 4.7 – Solução de Carnoy Grupo A (HE com magnificação 10x). Campo B (A), Campo A (B), área retangular da Fig. 4.7 – A. Nesta área não ocorreu osteonecrose (C) e área retangular da Fig. 4.7 – B. Nesta área também não ocorreu osteonecrose (D).....47

Figura 4.8 – Soro fisiológico 0,9% Grupo A (HE com magnificação 10x). Campo B (A), Campo A (B), área retangular da Fig. 4.8 – A. Nesta área não ocorreu osteonecrose (C) e área retangular da Fig. 4.8 – B. Nesta área também não ocorreu osteonecrose (D).....48

Figura 4.9 – Solução de Carnoy Grupo B (HE com magnificação 10x). Campo B (A), Campo A (B), área retangular da Fig. 4.9 – A. Nesta área não ocorreu osteonecrose e o coágulo sanguíneo está contornado em amarelo (C) e área retangular da Fig. 4.9 – B. As áreas focais de osteonecrose estão contornadas em verde; o coágulo sanguíneo está contornado em amarelo (D).....50

Figura 4.10 – Soro fisiológico 0,9% Grupo B (HE com magnificação 10x). Campo B (A), Campo A (B), área retangular da Fig. 4.10 – A. Nesta área não ocorreu osteonecrose nem coágulo sanguíneo (C) e área retangular da Fig. 4.10 – B. As áreas focais de osteonecrose estão contornadas em verde; o coágulo sanguíneo está contornado em amarelo (D).....51

Figura 4.11 – Solução de Carnoy Grupo C (HE com magnificação 10x). Campo B (A), Campo A (B), área retangular da Fig. 4.11 – A. A neoformação óssea está contornada em branco (C) e área retangular da Fig. 4.11 – B. A neoformação óssea está contornada em branco (D).....53

Figura 4.12 – Soro fisiológico 0,9% Grupo C (HE com magnificação 10x). Campo B (A), Campo A (B), área retangular da Fig. 4.12 – A. A neoformação óssea está contornada em branco (C) e área retangular da Fig. 4.12 – B. Nesta área não ocorreu neoformação óssea (D).....54

Gráfico 5.1 – Média do controle de peso pós-operatório dos animais dos B e C.....57

Figura 5.1 - Cortes análogos aos corados com HE, só que corados com Azul da Prússia e contracoloração de Carmalumen de Mayer (magnificação 10x).....64

LISTA DE TABELAS

Quadro 4.1 - Distribuição dos animais nos grupos experimentais e esquema das aplicações. Todas as cirurgias respeitaram esta mesma sequência por animal.....40

Tabela 4.1 – Grupo A. Em relação à aplicação da solução de Carnoy (CARNOY) e do soro fisiológico 0,9% (SORO), os pareamentos (números 1 a 5) com seus respectivos cortes histológicos, corte 1 em azul, 2 em magenta e 3 em verde-claro, significam amostras obtidas do mesmo animal.....49

Tabela 4.2 – Grupo B. Em relação à aplicação da solução de Carnoy (CARNOY) e do soro fisiológico 0,9% (SORO), os pareamentos dos números 1 a 5 com seus respectivos cortes histológicos, corte 1 em azul, 2 em magenta e 3 em verde-claro, significam amostras obtidas do mesmo animal.....52

Tabela 4.3 – Grupo C. Em relação à aplicação da solução de Carnoy (CARNOY) e do soro fisiológico 0,9% (SORO), os pareamentos dos números 1 a 5 com seus respectivos cortes histológicos, corte 1 em azul, 2 em magenta e 3 em verde-claro, significam amostras obtidas do mesmo animal.....55

Tabela 4.4 – Análise histomorfológica dos grupos A, B e C.....56

Tabela 5.1 – Comparação referente à quantidade de osteonecrose provocada pela solução de Carnoy (SC) e pelo soro fisiológico 0,9% (SF) do grupo A.....58

Tabela 5.2 – Representação estatística da análise histomorfológica quanto à necrose causada pela solução de Carnoy (SC) e pelo soro fisiológico 0,9% (SF) do grupo A 58

Tabela 5.3 – Comparação referente à quantidade de osteonecrose provocada pela solução de Carnoy (SC) e pelo soro fisiológico 0,9% (SF) do grupo B.....59

Tabela 5.4 – Comparação referente à quantidade de coágulo sanguíneo dentro do defeito ósseo monocortical após a aplicação da solução de Carnoy (SC) e do soro fisiológico 0,9% (SF) do grupo B.....59

Tabela 5.5 Representação estatística da análise histomorfológica quanto à quantidade de necrose e coágulo sanguíneo após a aplicação da solução de Carnoy (SC) e do soro fisiológico 0,9% (SF) do grupo B.....60

Tabela 5.6 – Comparação referente à quantidade de osteonecrose provocada pela solução de Carnoy entre os grupos A e B.....60

Tabela 5.7 – Comparação referente à quantidade de osteonecrose provocada pelo soro fisiológico 0,9% entre os grupos A e B.....61

Tabela 5.8 – Comparação referente à quantidade de osteonecrose provocada pela solução de Carnoy do grupo B com o soro fisiológico 0,9% do grupo A.....61

Tabela 5.9 – Representação estatística da análise histomorfológica quanto à quantidade de necrose, coágulo sanguíneo, infiltrado inflamatório, tecido de granulação e osso neoformado após a aplicação da solução de Carnoy entre os grupos A e B.....62

Tabela 5.10 –Representação estatística da análise histomorfológica quanto à quantidade de necrose, coágulo sanguíneo e infiltrado inflamatório após a aplicação da solução de Carnoy (SC) do grupo B e do soro fisiológico (SF) do grupo A.....62

Tabela 5.11 – Representação estatística da análise histomorfológica quanto à quantidade de necrose, coágulo sanguíneo e infiltrado inflamatório após a aplicação do soro fisiológico 0,9% (SF) entre os grupos A e B.....63

Tabela 5.12 – Comparação referente à quantidade de neoformação óssea após a aplicação da solução de Carnoy (SC) e do soro fisiológico 0,9% (SF) do grupo C.....63

Tabela 5.13 – Representação estatística da análise histomorfológica quanto à quantidade de tecido de granulação e neoformação óssea dentro do defeito ósseo monocortical após a aplicação da solução de Carnoy (SC) e do soro fisiológico 0,9% (SF) do grupo C.....64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AU	Ameloblastoma Unicístico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HE	Hematoxilina e Eosina
SC	Solução de Carnoy
SF	Soro fisiológico 0,9%
TOQ	Tumor Odontogênico Queratocístico

LISTA DE SÍMBOLOS

ml	mililitro
mm	milímetro
%	por cento (porcentagem)
g	grama
kg	quilograma
X	aumento de magnificação no microscópio
<	menor que

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....25
2 REVISÃO DE LITERATURA.....29
2.1 USOS DA SOLUÇÃO DE CARNOY ALÉM DE SEU EMPREGO EM CIRURGIA BUCO-MAXILO-FACIAL.....29
2.2 USOS DA SOLUÇÃO DE CARNOY EM CIRURGIA BUCO-MAXILO-FACIAL.....30
2.2.1 Benefícios.....30
2.2.2 Malefícios.....32
2.2.3 Como utilizá-la?.....34
3 PROPOSIÇÃO.....37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....39
4.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....40
4.2 PREPARO DOS ESPÉCIMES PARA AS ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....44
4.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS, PARÂMETROS AVALIADOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....46
4.3.1 Grupo A.....47
4.3.2 Grupo B.....49
4.3.3 Grupo C.....53
4.3.4 Análise histomorfológica dos grupos A, B e C.....55
5 RESULTADOS.....57
5.1 GRUPO A.....57
5.2 GRUPO B.....58
5.3 GRUPOS A e B.....60
5.4 GRUPO C.....63
5.5 COLORAÇÃO COM AZUL DA PRÚSSIA.....64
6 DISCUSSÃO.....67
7 CONCLUSÃO.....73
REFERÊNCIAS.....75
ANEXO 79

1 INTRODUÇÃO

As recidivas dos cistos e tumores odontogênicos de característica osteolítica que incidem na maxila e mandíbula são consideradas uma grande preocupação do cirurgião buco-maxilo-facial. Uma das técnicas utilizadas como medida profilática para que isso seja evitado, é a aplicação da solução de Carnoy no leito ósseo após a exérese dessas lesões, sendo uma ótima opção terapêutica que reconhecidamente pode diminuir o número de recidivas.

A literatura propõe fundamentalmente duas fórmulas da solução de Carnoy (SC): 1ª fórmula - 6 ml de etanol, 3 ml de clorofórmio e 1 ml de ácido glacial acético (Korhonen; Lindholm, 1969); e 2ª fórmula - 6 ml de álcool absoluto, 3 ml de clorofórmio, 1 ml de ácido glacial acético e 1 g de cloreto férrico (Cutler; Zollinger, 1933). A primeira fórmula da referida substância é utilizada em histologia com o objetivo de fixar células e tecidos, preservando os detalhes de seus núcleos. Já na segunda fórmula, também conhecida como solução de Carnoy modificada, Cutler e Zollinger (1933) aproveitaram suas propriedades esclerosantes e utilizaram-na com sucesso para diminuir o traumatismo cirúrgico de lesões situadas em áreas vitais.

Algum tempo depois, o uso da SC modificada foi difundido na prática da cirurgia buco-maxilo-facial no tratamento coadjuvante de tumores benignos localmente agressivos que acometem os maxilares, fundamentalmente os odontogênicos (Stoelinga; Peters, 1973; Voorsmit et al., 1981; Williams; Connor, 1994). Alguns cirurgiões também a utilizam no tratamento coadjuvante de tumores não odontogênicos (Puts et al., 1984; Rajeshkumar et al., 2013). Outras propriedades observadas após sua utilização nesses casos foi a cauterização local dos tecidos e hemostasia (Voorsmit et al., 1981).

Voorsmit[1] (1984 apud Stoelinga; Bronkhorst, 1988) verificou que a SC provocou 1,54 mm de osteonecrose em ossos cadavéricos com 5 minutos de exposição e 1,81 mm com 60 minutos. Nesse sentido, além das propriedades supracitadas, tal osteonecrose causada pela aplicação da SC após a remoção de

[1] Voorsmit RACA. The incredible keratocyst [thesis]. University of Nijmegen, 1984.

um tumor benigno do seu leito ósseo, inviabilizará suas células infiltradas no osso ou que, porventura, restaram após a remoção da lesão e/ou passaram desapercebidas aos olhos do cirurgião. Esse fenômeno produz uma margem de segurança adequada à cirurgia (Ribeiro Junior et al., 2012), o que se acredita ser um dos principais motivos da diminuição de recidivas das lesões.

A utilização da SC foi continuamente propagada entre os profissionais da cirurgia oral e maxilofacial, principalmente nas lesões como o tumor odontogênico queratocístico (TOQ) e ameloblastoma unicístico (AU). O principal pilar no qual se apoia o emprego dessa solução é a observação clínica da baixa incidência de recidivas tumorais após sua utilização, sendo seu uso indicado até os dias atuais (Blanas et al., 2000). Ela é rotineiramente empregada na prática clínica do cirurgião buco-maxilo-facial; contudo, devido à inexistência de um protocolo estabelecido para a sua utilização, a decisão de como usá-la pesa sobre ele, que muitas vezes a usa aleatoriamente. Atualmente, está proibido o uso de clorofórmio em medicamentos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do governo federal do Brasil (Brasil, 2015). Portanto, há uma tendência aqui e em outros países de não o incorporar à SC, mas sua efetividade terapêutica sem essa substância ainda não está comprovada.

Apesar de ser considerada clinicamente eficaz, pouco se sabe, do ponto de vista histológico, sobre suas reais consequências no osso. A importância desse conhecimento é fundamental visto que, para que se trate com segurança os pacientes, é necessária a compreensão das respostas biológicas em todos os sentidos do tratamento: do comportamento biológico das lesões até os efeitos terapêuticos da SC (Lee et al., 2004); porém, a vasta maioria dos estudos expõe somente diretrizes clínicas de seu uso (Voorsmit et al., 1981; Puts et al., 1984; Gosau et al., 2010; Pitak-arnnop, 2010; Ribeiro Junior et al., 2012; Ebenezer; Ramalingam, 2014). Logo, é muito importante investigar, em nível celular, os efeitos da SC sobre o osso mandibular (estrutura mais acometida pelos tumores odontogênicos). Esses efeitos são dicotômicos: terapêuticos e nocivos e em termos gerais, dependem do tempo de exposição entre a SC e a estrutura em questão. Um estudo que trouxe à luz esse assunto, demonstrou que o contato direto por até 2 minutos entre a SC e o nervo alveolar inferior de coelhos, provocou penetração no epineuro e perineuro, e de 2 a 5 minutos provocou penetração na bainha nervosa, comprometendo os axônios e diminuindo o número das células de Schwann que são

responsáveis por isolar eletricamente os nervos para permitir a rápida propagação dos potenciais de ação (Frerich et al., 1994). Outros autores observaram que o contato direto por até 5 minutos entre a SC e os vasos sanguíneos de ratos Wistar causou destruição da parede arterial, fibrose, edema e formação de trombo (Saulacic et al., 2009). Acredita-se que o acúmulo desses danos neurovasculares causam parestesias e diminuição da qualidade da reparação tecidual.

Outro assunto muito relevante é acerca da técnica de utilização da SC. Tanto na prática como na teoria, é quase unânime que a aplique, por meio de gaze ou algodão embebido, diretamente sobre o leito ósseo após a remoção de determinada lesão. Contudo, ainda há frequente disparidade de opiniões em relação ao tempo dessa aplicação, girando em torno de 1 minuto (Rao; Kumar, 2014); 3 minutos (Williams; Connor, 1994; Blanas et al., 2000; Lee et al., 2004; Ribeiro Junior et al., 2012; Rajeshkumar et al., 2013); um pouco mais de 3 minutos (Frerich et al., 1994) e 5 minutos (Stoelinga; Bronkhorst, 1988; Saulacic et al., 2009).

Como citado nos parágrafos acima, a vasta maioria dos estudos que tratam direta ou indiretamente da SC são caracteristicamente clínicos e, dentre outros parâmetros, reafirmam sua eficácia em diminuir recidivas tumorais. Apenas a investigação histológica de amostras obtidas de experimentos *in vivo* permite elucidar com precisão as respostas biológicas após seu uso. Tal conhecimento permitirá extrapolar os resultados para o uso clínico. Não obstante as tentativas da sociedade científica em substituir os estudos que utilizam animais, trata-se de uma metodologia muitas vezes fundamental para o desenvolvimento de estratégias médicas e terapias que serão aplicadas na clínica (Spicer et al., 2012).

Frente à inexistência de uma pesquisa que avalie histologicamente os efeitos imediatos e mediatos da SC sobre osso mandibular de quaisquer espécies, justificamos o desenvolvimento do presente trabalho em ratos Wistar. O que se propõem aqui, simula o que ocorre nas cirurgias nos seres humanos. É uma pesquisa inédita que se preocupa com as respostas biológicas do osso mandibular frente aos estímulos dessa solução e tem como principais objetivos a análise da quantidade de osteonecrose, coagulação e reparação do tecido ósseo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 USOS DA SOLUÇÃO DE CARNOY ALÉM DE SEU EMPREGO EM CIRURGIA BUCO-MAXILO-FACIAL

Ela sempre foi útil, direta ou indiretamente, ao universo cirúrgico. Portanto, torna-se fundamental uma rápida exposição das principais indicações de seu uso além do proposto na especialidade da cirurgia buco-maxilo-facial.

Em 1933, Cutler e Zollinger tentaram livrar alguns de seus pacientes de cirurgias arriscadas, apelidadas de “tarefas hercúleas”. Com a aplicação tópica da SC, eles conseguiram obter hemostasia e espessar o revestimento epitelial de astrocitomas cerebelares, facilitando a sua remoção. Também conseguiram fechar fístulas cervicais e anais somente com a aplicação da solução nos trajetos fistulosos. Ela também é uma substância que gera interesse aos patologistas, pois serve como um excelente fixador tecidual (Korhonen; Lindholm, 1969). A detecção de linfonodos de amostras obtidas de tumores malignos fixadas com a SC também pode ser facilitada. A SC cuja fórmula é composta por 60% de etanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido glacial acético, provou detectar um maior número de linfonodos de espécimes de adenocarcinoma de estômago em comparação aos espécimes fixados com formol 10% (Pereira et al., 2015; Dias et al., 2016). Isso é clinicamente relevante porque os linfonodos não detectados podem conter micrometástases e modificar o estadiamento e prognóstico dos pacientes oncológicos.

2.2 USOS DA SOLUÇÃO DE CARNOY EM CIRURGIA BUCO-MAXILO-FACIAL

2.2.1 Benefícios

Vários autores atestam que a aplicação local da SC no osso, após a remoção de alguns tumores benignos que incidem nos maxilares, assegura menor possibilidade de recidivas. Esses estudos que acumulam evidências clínicas sobre os benefícios do uso da solução, conduzidos em instituições nacionais e internacionais, são expostos a seguir de maneira sistemática: “autores (ano), instituição - país”.

Voorsmit et al. (1981), departamento de Cirurgia Oral e Maxilofacial da Universidade Católica de Nimega – Holanda, em um estudo prospectivo de casos, operaram 103 pacientes com 106 TOQ. Desses 106 TOQ, 40 foram enucleados, a mucosa associada nos locais de fenestração óssea foi removida e a SC foi aplicada no leito ósseo. Ocorreu recidiva em apenas 1 caso nos 2 primeiros anos após a cirurgia. A recidiva foi tratada com ressecção parcial do osso e da mucosa associada e, curiosamente, os autores aplicaram novamente a SC no leito remanescente.

Puts et al. (1984), departamento de Cirurgia Oral e Maxilofacial da Universidade Católica de Nimega – Holanda, relataram um caso de um paciente do sexo masculino, 77 anos de idade, com um sialocisto adenoma papilífero (tumor benigno raro das glândulas salivares menores) de crescimento exofítico e aspecto papilar medindo 16x13 mm na região posterior da mucosa palatina. Após a remoção total da lesão os autores aplicaram SC no osso subjacente para garantir a margem cirúrgica e não ocorreu recidiva dessa lesão.

Williams e Connor (1994), departamento de Patologia, Cirurgia Oral e Maxilofacial da Universidade de Iowa – EUA, consideram a aplicação da SC uma técnica de tratamento agressiva do TOQ e que sempre deve ser empregada na primeira cirurgia. Isso porque esse tumor apresenta altas taxas de recidivas e potencial de malignização.

Blanas et al. (2000), divisão de Cirurgia Oral e Maxilofacial do Hospital de Toronto – Canadá, em revisão sistemática das bases de dados *Index Medicus* e

Medline dos anos de 1956 a 1966 e 1966 a 2000, respectivamente, investigaram 14 trabalhos sobre o tratamento e prognóstico do TOQ e verificaram que em um total de 60 casos tratados com enucleação seguida da aplicação da SC, ocorreu recidiva em apenas 1 caso. Os autores concluíram que se trata de uma técnica cirúrgica com baixíssimo índice de recidivas, sendo o procedimento cirúrgico de escolha.

Stoelinga (2001), departamento de Cirurgia Oral e Maxilofacial do Hospital de Arnhem - Holanda, em um estudo prospectivo de casos, operaram 80 pacientes com um total de 68 TOQs na mandíbula e 14 na maxila, com maior prevalência na região posterior e anterior, respectivamente. Desses 82 TOQs, 43 tinham sido tratados com enucleação mais remoção da mucosa associada ao tumor seguida da aplicação da SC e ocorreram 3 recidivas (duas recorrências na mesma paciente em 3 anos e uma em outro paciente após 16 anos). O autor atribuiu essas recidivas ao acesso inadequado ao tumor no momento de sua remoção e presença do epitélio da lesão infiltrada nos tecidos moles. Stoelinga concluiu que, por causa do baixo número de recidivas após o uso da SC (3/43), sua utilização está recomendada, salvo nos casos próximos ao seio maxilar, órbita e parede lateral da fossa nasal.

Lee et al. (2004), departamento de Cirurgia Oral e Maxilofacial da Universidade de Hong Kong – Japão, em um estudo prospectivo de casos, operaram 22 AUs com a técnica de enucleação seguida da aplicação da SC e foram relatados 4 casos de recidivas, atribuídas, no exame histológico, à invasão mural do tumor. Do ponto de vista clínico, duas dessas quatro recorrências tinham dentes relacionados com o tumor, os quais não foram extraídos no momento da primeira cirurgia. Os autores concluíram que a enucleação do AU mais a remoção dos dentes envolvidos seguida da aplicação da SC sobre o leito ósseo é um método efetivo de tratamento e apresenta baixo índice de recidivas.

Ribeiro Junior et al. (2012), departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e Hospital Universitário da Universidade de São Paulo – Brasil, em um estudo retrospectivo de casos do ano de 2003 a 2008, verificaram que dos 22 TOQs tratados por curetagem mais ostectomia periférica seguida de aplicação da SC, ocorreu uma recidiva. Contudo, esse paciente apresentava síndrome de Gorlin e, na verdade, ela pode ter sido uma lesão nova e não uma recorrência verdadeira. Os autores reafirmam que o uso da SC produz uma margem segura no tratamento de alguns tumores benignos localmente invasivos dos maxilares.

Rajeshkumar et al. (2013), departamento de Cirurgia Oral e Maxilofacial do Hospital Bapuji - Índia, em um estudo prospectivo de casos conduzidos do ano de 2006 a 2010, operaram 7 TOQs, 2 ameloblastomas sólidos, 2 AUs e 1 fibroma ossificante juvenil e adicionalmente aplicaram a SC cuja fórmula era composta por 60 cm^3 de álcool absoluto, 30 cm^3 de clorofórmio e 10 cm^3 de ácido glacial acético, após a enucleação e/ou curetagem desses tumores. Os autores relatam não ter ocorrido recidiva em nenhum caso e afirmam que para os TOQs, a efetividade da aplicação da solução praticamente se iguala à técnica de ressecção. No caso dos AUs, a utilização da SC após a enucleação da lesão está plenamente indicada; já para os ameloblastomas sólidos e casos selecionados de fibroma ossificante juvenil, a aplicação da solução após a curetagem dessas lesões pode ser uma tentativa quando se deseja uma cirurgia mais conservadora. Eles não incorporam o cloreto férrico à SC por alegarem ser carcinogênico.

Rao e Kumar (2014), Instituto de Ciências Médicas e Pesquisa de Amritsar – Índia, em um estudo retrospectivo de casos do ano de 2006 a 2011, demonstraram que dos 34 TOQs tratados com enucleação seguida de aplicação da SC, ocorreram apenas 2 recidivas. Tais recidivas foram novamente tratadas com enucleação seguida de aplicação da SC. Os autores concluíram que essas recorrências ocorreram nos casos em que a primeira cirurgia foi em região dentada e a presença das raízes dificultaram o acesso a toda lesão.

2.2.2 Malefícios

O uso da SC pode causar danos em estruturas anatômicas nobres como nervos e vasos sanguíneos, aumentando a morbidade pós-operatória e gerando impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes submetidos à cirurgia das lesões da região buco-maxilo-facial. É importante o conhecimento desses danos, para que se indique e utilize a SC de maneira cautelosa e consciente.

Nervos alveolares inferiores de coelhos expostos a 5 ml da solução por 30 segundos, 1, 2, 3, 5 e 10 minutos e submetidos à avaliação do potencial somatosensorial não demonstraram alteração de condutibilidade até 2 minutos de

exposição; após 3 minutos, ocorreu nenhuma alteração sensitiva até a diminuição parcial da sensibilidade. De 5 a 10 minutos, os potenciais somatosensoriais dos nervos estavam ausentes. As mesmas amostras foram submetidas à análise histomorfométrica após coloração com Azul da Prússia, para detectar a profundidade de necrose tecidual. Até 2 minutos de exposição, houve penetração confinada no epineuro e perineuro. Após 3 minutos, houve violação da bainha nervosa e contato da solução com o conteúdo neural em algumas áreas. Após 5 minutos, houve piora da violação da bainha nervosa (Frerich et al., 1994). Já na avaliação do potencial de ação composto de nervos safenos de ratos Wistar antes e após 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 75, 90, 105, 120 minutos de exposição à SC formulada com 60 ml de álcool absoluto, 30 ml de clorofórmio e 10 ml de ácido glacial acético, a partir de 2 minutos o potencial diminuiu drasticamente. Alguns nervos expostos à SC e avaliados no pós-operatório de 20 dias demonstraram pequenos potenciais com a velocidade de condução e amplitude dos impulsos significativamente menores do que o grupo controle. Loescher e Robinson (1998) concluíram que após 2 minutos de exposição à SC há bloqueio da condução nervosa e danos apreciáveis aos nervos safenos dos ratos Wistar.

Vasos sanguíneos da fossa axilar de ratos Wistar expostos a 1 ml de SC (6 ml de álcool absoluto, 3 ml de clorofórmio e 1 ml de ácido glacial acético) apresentaram hialinização das veias após 2 minutos, trombo venoso com perda focal da camada túnica após 5 minutos e perda significante das células endoteliais de artérias e veias após 10 minutos. Os animais que receberam aplicação de 1 ml da SC por 5 minutos, foram avaliados no pós-operatório e demonstraram, além das alterações supracitadas, só que em maior extensão, infiltrado inflamatório crônico e deposição de hemossiderina na primeira semana; infiltrado inflamatório crônico com pigmentos de hemossiderina, áreas de fibrose e edema com destruição arterial, preenchimento da luz do vaso com trombo e recanalização na segunda semana e melhora de todo esse padrão na terceira semana. As alterações após 5 minutos foram, do ponto de vista clínico, as mais relevantes para Saulacic et al. (2009).

As complicações pós-operatórias avaliadas retrospectivamente em 14 pacientes após curetagem e ostectomia periférica do TOQ seguida de uma aplicação de SC de 3 minutos sobre o osso foram: um caso de infecção moderada, quatro casos de parestesia e cinco casos de deiscência. Ocorreu uma recidiva após 8 meses da

primeira cirurgia; contudo, o paciente era portador da síndrome do carcinoma nevóide de células basais e essa recidiva, na verdade, pode ter sido uma nova lesão. Uma aplicação da SC por esse tempo, após a remoção do TOQ e tratamento da cavidade óssea, é uma maneira efetiva de tratamento e os casos de parestesias resolveram no período pós-operatório (Ribeiro Junior et al., 2012).

2.2.3 Como utilizá-la?

Há certa divergência de opiniões na literatura e prática clínica quanto ao tempo ideal da aplicação da SC sobre o leito ósseo. Nos parágrafos a seguir será exposto brevemente como os cirurgiões a têm utilizado no tratamento de seus pacientes e algumas orientações obtidas de estudos laboratoriais.

O primeiro relato da utilização da SC diretamente em seres humanos ocorreu após sua aplicação por 1 minuto, por meio de algodão embebido, no revestimento interno de astrocitomas cerebelares; isso proporcionou hemostasia e espessamento das paredes dessas lesões permitindo removê-las em porções maiores, ou seja, com um melhor controle intra-operatório. A SC também foi injetada, por um período que variou de 2 a 5 minutos, em fístulas cervicais que se estendiam até os pilares tonsilares e, no acompanhamento pós-operatório, os trajetos fistulosos fecharam por si. Também foi injetada em um cisto pilonidal infectado por 10 minutos com seu fechamento após 38 dias. Em outro cisto pilonidal infectado, foi injetada por 5 minutos no primeiro dia, 10 minutos no segundo e 10 minutos semanalmente nas próximas duas semanas; com isso, ocorreu seu fechamento e cura em um período de 3 meses. A SC é uma substância química que apresenta baixos riscos ao paciente além de causar pouca desfiguração cicatricial. Ela deve ser utilizada principalmente em pequenas fístulas de revestimento epitelial com poucas células de profundidade (Cutler; Zollinger, 1933). Esse conceito pode ser julgado útil para o tratamento de tumores com arquitetura cística que acometem os maxilares, ao passo que sua aplicação diretamente no lúmen cístico espessaria suas paredes para

facilitar a enucleação de lesões friáveis como o TOQ, por exemplo. Provavelmente, essa é a lesão que mais recebe a aplicação da SC como tratamento coadjuvante: após sua curetagem, ela pode ser aplicada seletivamente para cauterizar áreas que surtiram dúvidas quanto à efetividade da exérese (Voorsmit et al., 1981). Entretanto, deve-se evitar seu contato com raízes de dentes vitais e seio maxilar. No caso de tumores multiloculares e/ou localizados no ramo mandibular, sua aplicação deve ocorrer ao longo de toda loja cirúrgica, pois esses casos são mais prováveis de recorrerem. Em contrapartida, Voorsmit[2] (1984 apud Stoelinga; Bronkhorst, 1988) recomenda aspirar o conteúdo cístico do TOQ e instilar a SC em seu aspecto intraluminal durante cinco minutos. Após a enucleação da lesão, ela é novamente aplicada no leito ósseo por mais cinco minutos. Uma técnica interessante é corar a cavidade com azul de metileno após a curetagem do TOQ, a fim curetar adicionalmente as áreas pigmentadas; então, Williams e Connor (1994) recomendam aplicar a SC no leito ósseo por 3 minutos. Nos casos em que o nervo alveolar inferior está exposto no sítio cirúrgico, ele é protegido com substâncias semissólidas e nos locais em que há fenestração óssea por causa da invasão tumoral, é fundamental remover a mucosa oral associada a essa região. A aplicação da SC por 3 minutos sobre o leito ósseo apresenta uma taxa de recorrência que pode ser comparada à técnica de ressecção, contudo, sem a necessidade de uma cirurgia tão agressiva (Blanas et al., 2000).

Stoelinga (2001) também recomenda o preenchimento da cavidade com gaze embebida na SC, imediatamente após a remoção do TOQ com sua mucosa de recobrimento. A utilização da SC se torna ainda mais necessária nas lesões multiloculares; contudo, é imperativo que se removam todos os septos antes da aplicação. Nos casos de recidiva, uma abordagem mais conservadora com a excisão da mucosa de recobrimento e novamente a aplicação da SC na cavidade óssea seria a técnica ideal.

Nos casos de AU, Lee et al. (2004) recomendam o seguinte protocolo: enucleação cuidadosa seguida da aplicação da SC, por meio de algodão ou gaze embebida, na cavidade óssea durante 3 minutos. Após a aplicação da solução, lava-

[2] Voorsmit RACA. The incredible keratocyst [thesis]. University of Nijmegen, 1984.

se copiosamente a cavidade com solução salina; a cavidade é mantida aberta e preenchida com gaze impregnada de pasta de parafina com iodofórmio e bismuto, a qual deve ser trocada periodicamente até que haja cicatrização por segunda intenção.

Gosau et al. (2010), semelhantemente ao Voorsmit[3] (1984), preenchem o aspecto intraluminal do TOQ com o líquido da SC durante 3 minutos e então, procedem com a enucleação da lesão. Após sua remoção, o uso adicional da solução no leito ósseo dependerá somente da decisão do cirurgião e não necessariamente dos aspectos clínicos da lesão. A técnica proposta anteriormente foi questionada por Pitak-Arnnop (2010) porque a aplicação da SC dentro dos tumores antes de sua remoção, pode danificar as células da lesão e impossibilitar um diagnóstico histológico correto.

Além da tentativa de enucleação cautelosa ou curetagem do TOQ, Ribeiro Júnior et al. (2012) realizam ostectomia periférica em todo leito ósseo seguida da aplicação da SC, por meio de gaze embebida, por 3 minutos e finalizam com lavagem abundante com solução salina. Em lesões maiores que 3 cm, as aplicações têm que alcançar todos os locais de difícil acesso; a gaze pode ser adaptada na cavidade ainda seca e então, é encharcada com a solução em um volume que não extravase para os tecidos adjacentes. Rajeshkumar et al. (2013) também aplicam a SC no leito ósseo por 3 minutos, inclusive após a remoção de casos selecionados de ameloblastoma sólido e fibroma ossificante juvenil, ao passo que Rao e Kumar (2014) removem o TOQ e aplicam a SC por 1 minuto.

[3] Voorsmit RACA. The incredible keratocyst [thesis]. University of Nijmegen, 1984.

3 PROPOSIÇÃO

Frente aos achados da literatura propusemo-nos a analisar histologicamente e quantificar a osteonecrose, coágulo sanguíneo e neoformação óssea 0, 3 e 10 dias após a aplicação da solução de Carnoy (teste) e do soro fisiológico 0,9% (controle) em defeitos ósseos monocorticais realizados na mandíbula de ratos Wistar *in vivo*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (protocolo nº 01/2015, ANEXO A). Quinze animais da espécie *Rattus Norvegicus* e raça Wistar, provenientes do Biotério de produção de ratos para pesquisa da Rede de biotérios da Universidade de São Paulo, com idade mínima de 60 dias e pesando entre 250 e 350 g foram alocados para o presente trabalho. Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da USP e os animais permaneceram em gaiolas coletivas de policarbonato com ventilação e exaustão de ar forçadas, temperatura ambiente de 24º C, ciclo 12 horas claro e 12 horas escuro e acesso a ração e água à vontade por, no mínimo, 7 dias antes das cirurgias. Eles foram igualmente subdivididos em 3 grupos de acordo com o período de coleta das amostras após as cirurgias, que consistiram na criação de defeitos ósseos monocorticais na face vestibular do corpo mandibular, bilateralmente, de cada animal para a aplicação da solução de Carnoy (SC, substância teste - 6 ml de álcool absoluto, 3 ml de clorofórmio, 1 ml de ácido glacial acético e 1 g de cloreto férrico) ou de soro fisiológico 0,9% (SF, substância controle) como demonstra o Quadro 4.1.

A distribuição dos animais respeita o que está estabelecido no parágrafo 4 do artigo 14º da Lei n º 11.794 de 8 de outubro de 2008 (Brasil, 2008), o qual afirma que o número de animais a ser utilizado deve ser o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo da pesquisa. Como os procedimentos são realizados dos dois lados da mandíbula de cada animal, otimizamos o número de amostras.

Quadro 4.1 - Distribuição dos animais nos grupos experimentais e esquema das aplicações. Todas as cirurgias respeitaram esta mesma sequência por animal

Grupos experimentais (tempo de coleta dos espécimes)	**nº de animais**	**nº de amostras**	
		teste	**controle**
Grupo A (imediata)	5	5	5
Grupo B (3 dias após a cirurgia)	5	5	5
Grupo C (10 dias após a cirurgia)	5	5	5
1º) substância teste: uma aplicação de 5 minutos de 0,1 ml de **solução de Carnoy (SC)** do lado direito da mandíbula.			
2º) substância controle: uma aplicação de 5 minutos de 0,1 ml de **soro fisiológico 0,9% (SF)** do lado esquerdo da mandíbula.			

Vale destacar que a face vestibular do corpo mandibular do rato Wistar é uma região com espessura e altura suficientes e, acreditamos que seja o único local possível de criar um defeito ósseo monocortical para receber as aplicações de SC e SF com um bom controle intra-operatório. Sua mandíbula também é estruturalmente semelhante à do ser humano; destarte, essa estrutura óssea que é a mais acometida pelos tumores odontogênicos, permanece como objeto de estudo da presente dissertação de mestrado.

4.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Cada animal foi pesado e a anestesia geral realizada pela injeção intraperitoneal de uma mistura 100 mg/kg de quetamina para 10 mg/kg de xilazina, de acordo com o peso do rato (Chin et al., 2013). Posicionamos o animal anestesiado em decúbito dorsal, procedendo com a antissepsia extra-oral e foram infiltrados 0,6 ml de lidocaína/epinefrina a 2%/1:200.00 em cada região submandibular a ser manipulada. Após o tempo de latência do anestésico local, uma

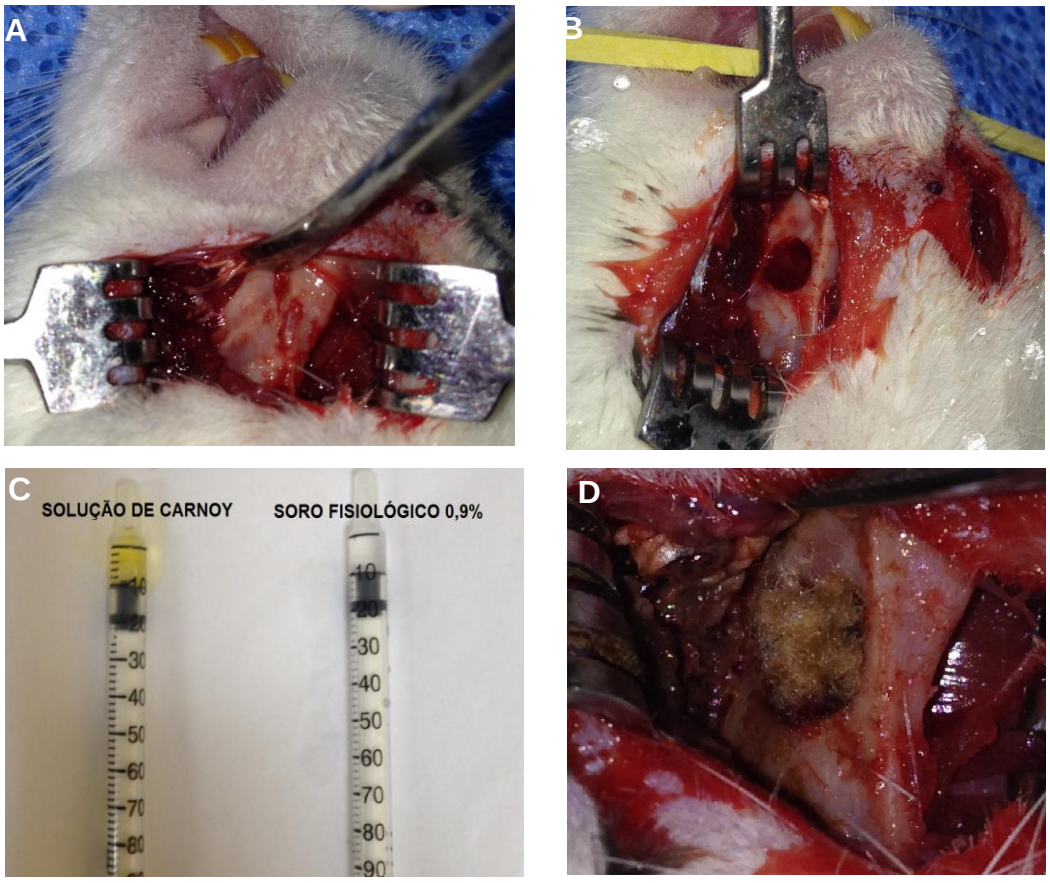
pequena perfuração com tesoura íris foi realizada na pele acima do ângulo mandibular direito do animal, seguida de divulsão do plano subcutâneo no sentido anterior e, então, foi realizada uma incisão de cerca de 15 mm tangenciando a base mandibular. O auxiliar afasta a pele com 2 afastadores senn-muller e com um elevador de Freer apoiado na região mais anterior da base da mandíbula, elevamos, no sentido posterior, o periósteo e a borda anterior do músculo masseter, sempre tangenciando a base da mandíbula. Esses tecidos moles foram incisados com a tesoura íris e agora, o auxiliar os afasta em um único conjunto; isso expõe uma linha oblíqua que corre no sentido supero-inferior e anteroposterior, sendo essa, a principal referência anatômica para posicionar adequadamente a broca e realizar o defeito monocortical com uma ponta diamantada de 3 mm de diâmetro por 1 mm de espessura (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Ponta diamantada com formato discoide montada no contra-ângulo que realizará o defeito ósseo monocortical na mandíbula

Após o acesso cirúrgico do lado direito, o lado esquerdo da mandíbula foi exposto antes da confecção dos defeitos monocorticais. No momento da perfuração óssea, o auxiliar expõe o campo operatório enquanto o operador dá suporte e eleva sutilmente a mandíbula do animal com uma pinça de Addison dentada. A perfuração foi realizada primeiro na face vestibular direita, exatamente acima da linha oblíqua, com 1.500 rpm sob irrigação com soro; esse é o momento mais crítico do procedimento pois a broca deve penetrar somente até meio milímetro dentro do osso, ou seja, metade da broca (a confecção de um “*stop*” em resina acrílica na ponta diamantada pode auxiliar nesse cuidado); após a perfuração, a cavidade criada foi limpa com soro fisiológico e algodão estéril. Subsequentemente, outro

pequeno pedaço de algodão estéril seco foi uniformemente posicionado dentro de todo o defeito monocortical de forma que o mesmo ficou preenchido completamente e encharcado com 0,1 ml de SC, permanecendo em posição por 5 minutos, com um instrumento rombo o pressionando levemente para assegurar que a solução estivesse em contato ao longo de todo leito ósseo; o líquido extravasado foi aspirado (Figura 4.2 – A, B, C e D). Passado o tempo de aplicação da SC, o algodão foi removido e o campo operatório lavado com soro. Finalizada essa etapa, o defeito ósseo monocortical e a aplicação do SF foram realizados do lado esquerdo da mandíbula, seguindo exatamente a mesma técnica.

Figura 4.2 – Procedimento cirúrgico (Grupo A). Acesso cirúrgico (A), defeito ósseo monocortical (B), SC e SF antes das aplicações sobre o osso (C) e algodão embebido com 0,1 ml de solução de Carnoy e em contato com mesmo defeito demonstrado em B (D)



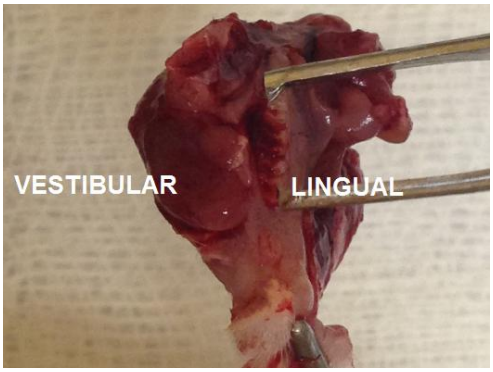
Os animais do grupo A foram sacrificados imediatamente após as aplicações das soluções teste e controle. Os do grupo B e C receberam suturas no plano muscular/cutâneo do acesso cirúrgico e aguardaram 3 e 10 dias para serem

sacrificados, respectivamente. No momento da recuperação pós-anestésica, eles receberam uma dose inicial de 0,15 ml de xarope doce de dipirona sódica via oral e doses adicionais de 6/6 horas pelas primeiras 24 horas de pós-operatório. A ração peletizada sólida também foi disponibilizada em pó e a água disponibilizada à vontade.

Após os sacrifícios, os espécimes foram coletados pela ressecção da mandíbula com uma broca tronco-cônica, alguns milímetros além do defeito monocortical que recebeu as aplicações das soluções (Figura 4.3). Os animais dos grupos B e C receberam anestesia geral, foram sacrificados, as suturas removidas e toda a mandíbula exposta; então, os espécimes foram coletados tomando-se o cuidado para que uma porção de músculo masseter permanecesse sobre os defeitos, a fim de preservar o periósteo ao longo de todo o preparo para as análises histológicas (Figura 4.4).

Figura 4.3 – Espécime removido do animal da Figura 4.2, imediatamente antes de sua fixação em formol

Figura 4.4 – Vista superior de um espécime removido de um animal do grupo B. Uma porção do músculo masseter não foi removida para continuar revestindo o defeito monocortical e preservar o periósteo

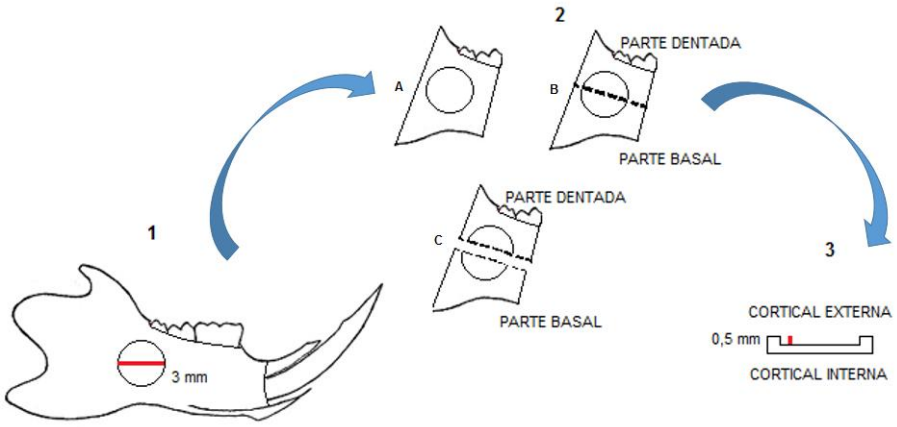


4.2 PREPARO DOS ESPÉCIMES PARA AS ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Após as coletas, os espécimes foram imediatamente imersos em solução fixadora contendo 2% glutaraldeído + 2,5% formaldeído (preparado a partir do paraformaldeído) tamponado em solução cacodilato 0,1 Molar de pH 7,4. Subsequentemente as amostras foram submetidas à irradiação em forno de micro-ondas Pelco 3440 (Ted Pella, Redding, CA, USA) operando em potência de 100% em três ciclos de cinco minutos (a cada ciclo, a solução fixadora era trocada por uma fresca) em temperatura máxima de 37°C. Após a fixação em microondas, os espécimes foram transferidos para um fixador por 6 horas em temperatura ambiente, e depois desse período, o material permaneceu *overnight* a 4º Celsius. No dia seguinte, foram lavados em solução tampão de cacodilato 0,05 Molar, e seguidos para descalcificação em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 4,13%.

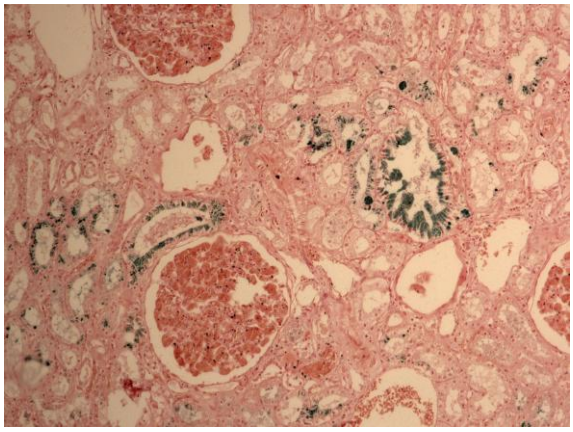
Após a descalcificação, os espécimes foram cortados ao meio, paralelamente ao plano oclusal, lavados em tampão cacodilato diluído em 5 ciclos de 10 minutos, desidratados na sequência crescente de etanol, clareados em xilol, infiltrados e incluídos em parafina no plano axial por meio do sistema LEICA EG 1160. Esses blocos foram seccionados no micrótomo Microm HM-360 em espessura de 5 micrômetros para a obtenção de uma lâmina com 3 cortes histológicos por espécime (3 cortes histológicos por lâmina e 10 lâminas por grupo – cada lâmina é equivalente a uma amostra obtida da aplicação da SC ou SF); a Figura 4.5 ilustra o diagrama de todo esse processo. Esses cortes foram corados com Hematoxilina & Eosina (HE) para análise histológica. Cortes histológicos análogos aos corados com HE foram corados com Azul da Prússia (Figura 4.6; Figura 5.1 – em resultados) para investigarmos se houve penetração do cloreto férrico da SC no tecido ósseo exposto a ela. Tal coloração trata-se de uma de uma técnica de análise histoquímica que consiste na combinação de ferrocianetos (II) e (III) com os íons de ferro (+3) presente nos tecidos (Senese, 2010). Na presente dissertação, a hipótese é que ocorra uma pigmentação em azul no tecido ósseo que seria por causa do cloreto férrico da solução de Carnoy.

Figura 4.5 – Diagrama demonstrativo do preparo dos espécimes após sua coleta



1. Defeito ósseo monocortical de 3 mm de diâmetro (linha vermelha), onde foram realizadas as aplicações da solução de Carnoy (teste) e do soro fisiológico 0,9% (controle).
2. A - O espécime foi ressecado da mandíbula com margem de segurança e preparado para a descalcificação no EDTA;
   B - Após a descalcificação, o espécime foi seccionado ao meio no plano axial.
   C - Agora, na verdade, são 2 metades do mesmo espécime: parte dentada e parte basal. Cada metade foi incluída na parafina com o centro do defeito voltado para a superfície mais externa da inclusão; isso facilitou a obtenção dos cortes histológicos, pois saberíamos que os cortes partiriam meio para a periferia do defeito.
3. Espécime visto no planto axial. A linha vermelha representa a profundidade do defeito. Lembrando que, no momento das aplicações, a SC e SF permaneceu em contato com todo o leito ósseo.

Figura 4.6 – Corte histológico obtido de um rim de paciente humano corado com Azul da Prússia com contracoloração de Carmalumen de Mayer (magnificação 10x). Ele representa o controle da coloração das amostras que receberam as aplicações da solução de Carnoy e soro fisiológico 0,9%, indicando que não houve falhas no processo



4.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS, PARÂMETROS AVALIADOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Cada grupo teve 30 cortes histológicos avaliados de forma cega por um patologista no microscópio de luz convencional (Leica DM2500) sob foco fixo e clareza de campo com magnificação de 20X. Foi realizada uma classificação histomorfológica quanto à necrose óssea, ao coágulo, ao infiltrado inflamatório, ao tecido de granulação e ao osso neoformado em que lhes foi atribuído notas de acordo com a percepção do profissional.

Após isso, todos os cortes tiveram sua periferia esquerda (campo A) e direita (campo B) capturada pela câmera Leica DFC 295 acoplada no microscópio Leica DM2500 num aumento de 10x e cada imagem transferida ao software ImageJ® versão 1.37a, em código fonte Java, de domínio público (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Cada campo foi reduzido a uma área retangular a partir da borda do defeito monocortical até seu limite oposto e, em profundidade, aproximadamente duas vezes a espessura da cortical óssea; essa área foi quantificada em pixels. Por meio da ferramenta *freehand selection* e dentro da área retangular, parâmetros como osteonecrose, coágulo sanguíneo e neoformação óssea foram contornados e quantificados em pixels, de acordo com o grupo específico. O total de pixels de cada parâmetro foi dividido pelo total de pixels da área retangular e esse valor, multiplicado por cem para a obtenção da porcentagem. Após a avaliação dos parâmetros, as amostras foram reveladas.

Todos os dados foram organizados no Microsoft Excel® (versão MS-Office 2013) e os resultados, obtidos com a utilização do pacote estatístico IBM SPSS versão 23.0 (Statistical Package for Social Sciences).

4.3.1 Grupo A

Somente a osteonecrose foi quantificada nesse grupo (Figura 4.7 – A, B, C e D; Figura 4.8 - A, B, C e D e Tabela 4.1) e foi aplicado o Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon para verificar se a solução de Carnoy causou mais osteonecrose do que o soro fisiológico 0,9%. O valor de p <0,05 significa que houve uma diferença estatisticamente significante entre a substância teste e a controle.

Figura 4.7 – Solução de Carnoy Grupo A (HE com magnificação 10x). Campo B (A), Campo A (B), área retangular da Fig. 4.7 – A. Nesta área não ocorreu osteonecrose (C) e área retangular da Fig. 4.7 – B. Nesta área também não ocorreu osteonecrose (D)

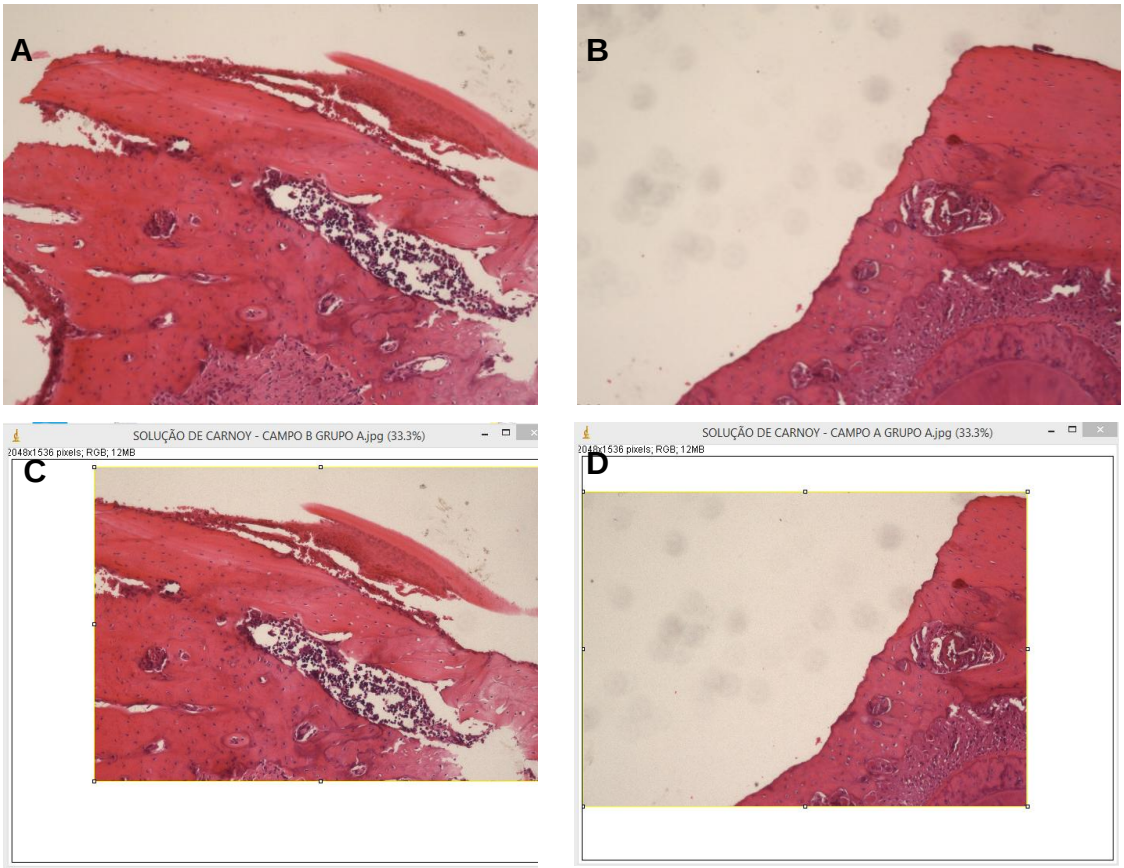


Figura 4.8 – Soro fisiológico 0,9% Grupo A (HE com magnificação 10x). Campo B (A), Campo A (B), área retangular da Fig. 4.8 – A. Nesta área não ocorreu osteonecrose (C) e área retangular da Fig. 4.8 – B. Nesta área também não ocorreu osteonecrose (D)

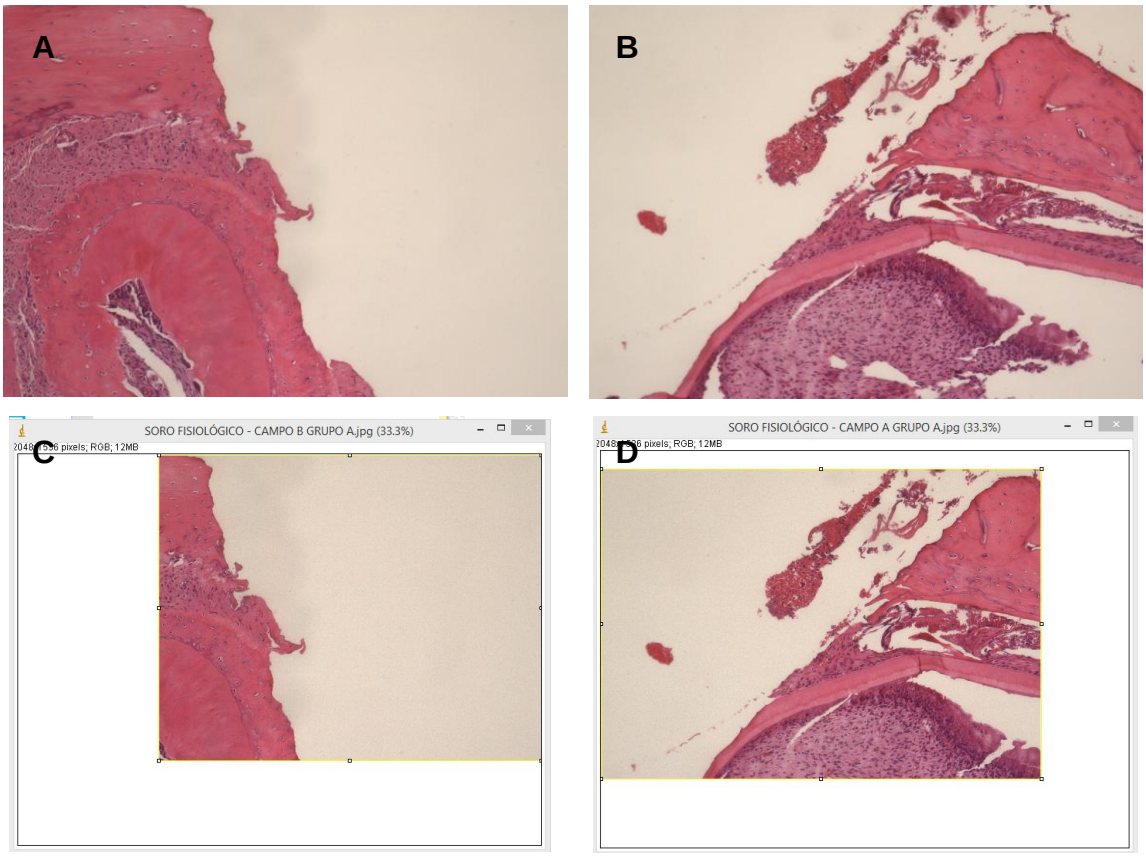


Tabela 4.1 – Grupo A. Em relação à aplicação da solução de Carnoy (**CARNOY**) e do soro fisiológico 0,9% (**SORO**), os pareamentos dos números 1 a 5 com seus respectivos cortes histológicos, corte 1 em azul, 2 em magenta e 3 em verde-claro, significam amostras obtidas do mesmo animal

AMOSTRA	Área do retângulo	Área de necrose	% Área de necrose	AMOSTRA	Área do retângulo	Área de necrose	% Área de necrose
1 - CARNOY				1 - SORO			
campoAcorte1	2252907	0	0	campoAcorte1	2006550	17937	0,893922404
campoBcorte1	950988	0	0	campoBcorte1	1816800	0	0
campoAcorte2	2318607	0	0	campoAcorte2	2004336	0	0
campoBcorte2	923052	0	0	campoBcorte2	1562982	3750	0,239925988
campoAcorte3	2244816	2319	0,103304681	campoAcorte3	2302344	10775	0,468001306
campoBcorte3	1022790	0	0	campoBcorte3	1707180		0
2 - CARNOY				2 -SORO			
campoAcorte1	1843776	5880	0,318910757	campoAcorte1	1635336	25250	1,544025203
campoBcorte1	870600	0	0	campoBcorte1	991620	0	0
campoAcorte2	1759200	15786	0,8973397	campoAcorte2	2060378	12978	0,629884419
campoBcorte2	796500	4697	0,589704959	campoBcorte2	924528	0	0
campoAcorte3	1828224	1194	0,065309284	campoAcorte3	1916847	15089	0,787178111
campoBcorte3	863226	7038	0,815313719	campoBcorte3	1039290	0	0
3 - CARNOY				3 - SORO			
campoAcorte1	1832193	0	0	campoAcorte1	2189124	257	0,011739856
campoBcorte1	1844934	0	0	campoBcorte1	1537899	9823	0,638728551
campoAcorte2	1611216	0	0	campoAcorte2	2202876	1105	0,050161698
campoBcorte2	2011836	0	0	campoBcorte2	1359558	0	0
campoAcorte3	1573722	0	0	campoAcorte3	2294838	2619	0,114125703
campoBcorte3	2170662	0	0	campoBcorte3	1172655	0	0
4 - CARNOY				4 - SORO			
campoAcorte1	1787040	0	0	campoAcorte1	2234124	0	0
campoBcorte1	1080888	3373	0,312058234	campoBcorte1	1367058	0	0
campoAcorte2	1838043	0	0	campoAcorte2	1930068	0	0
campoBcorte2	1001280	31422	3,138183126	campoBcorte2	1719279	0	0
campoAcorte3	1492884	0	0	campoAcorte3	1525590	0	0
campoBcorte3	870336	0	0	campoBcorte3	1147833	10269	0,894642339
5 - CARNOY				5 - SORO			
campoAcorte1	2104335	0	0	campoAcorte1	1782126	1084	0,060826227
campoBcorte1	2234400	0	0	campoBcorte1	1222560	1896	0,155084413
campoAcorte2	2035440	0	0	campoAcorte2	1990485	2796	0,140468278
campoBcorte2	2034330	0	0	campoBcorte2	1586520	9153	0,576923077
campoAcorte3	1852380	0	0	campoAcorte3	1451412	0	0
campoBcorte3	2017638	0	0	campoBcorte3	1556076	9199	0,591166498

4.3.2 Grupo B

A osteonecrose e o coágulo sanguíneo foram quantificados nesse grupo (Figura 4.9 – A, B, C e D; Figura 4.10 - A, B, C e D e Tabela 4.2) e foi aplicado o Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon para verificar se a solução de Carnoy causou mais osteonecrose que o soro fisiológico 0,9% e se a quantidade de coágulo formado nos defeitos ósseos foi maior para a SC ou para o SF. O valor de p <0,05 significa que

houve uma diferença estatisticamente significante entre a substância teste e a controle.

Figura 4.9 – Solução de Carnoy Grupo B (HE com magnificação 10x). Campo B (A), Campo A (B), área retangular da Fig. 4.9 – A. Nesta área não ocorreu osteonecrose e o coágulo sanguíneo está contornado em amarelo (C) e área retangular da Fig. 4.9 – B. As áreas focais de osteonecrose estão contornadas em verde; o coágulo sanguíneo está contornado em amarelo (D)

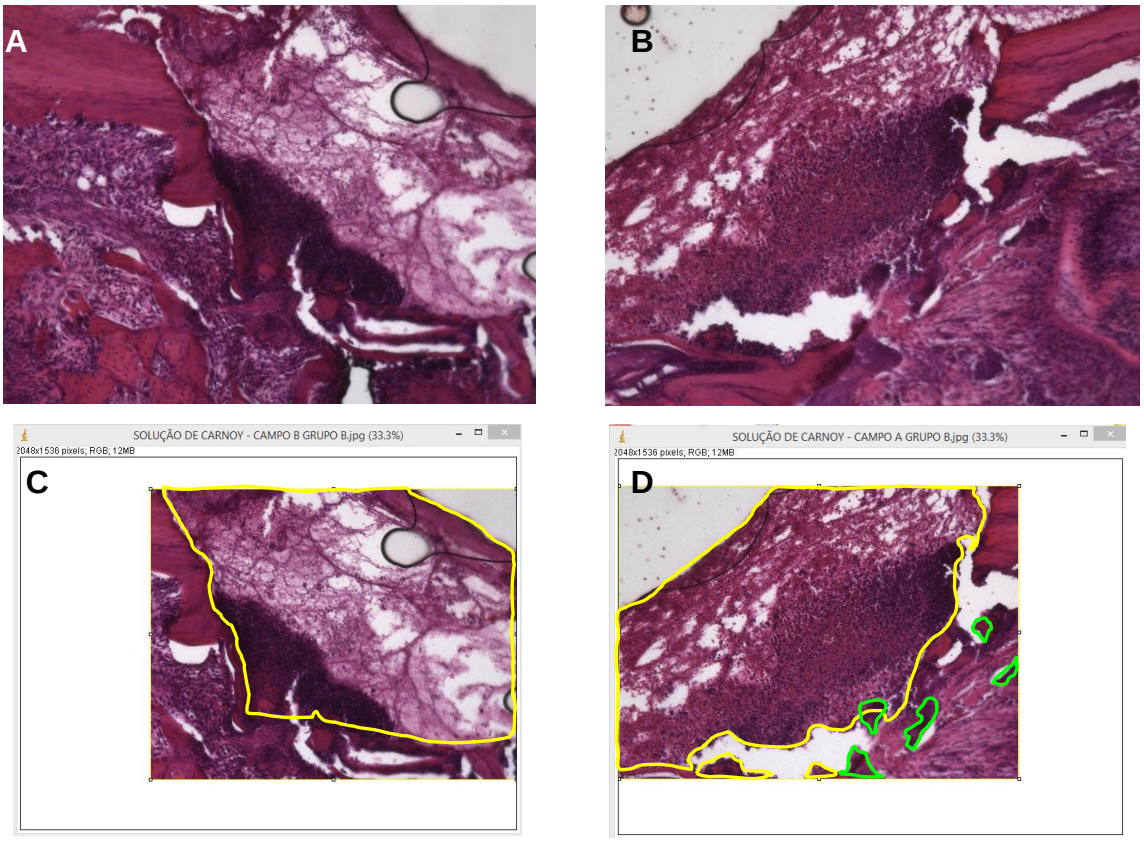


Figura 4.10 – Soro fisiológico 0,9% Grupo B (HE com magnificação 10x). Campo B (A), Campo A (B), área retangular da Fig. 4.10 – A. Nesta área não ocorreu osteonecrose nem coágulo sanguíneo (C) e área retangular da Fig. 4.10 – B. As áreas focais de osteonecrose estão contornadas em verde; o coágulo sanguíneo está contornado em amarelo (D)

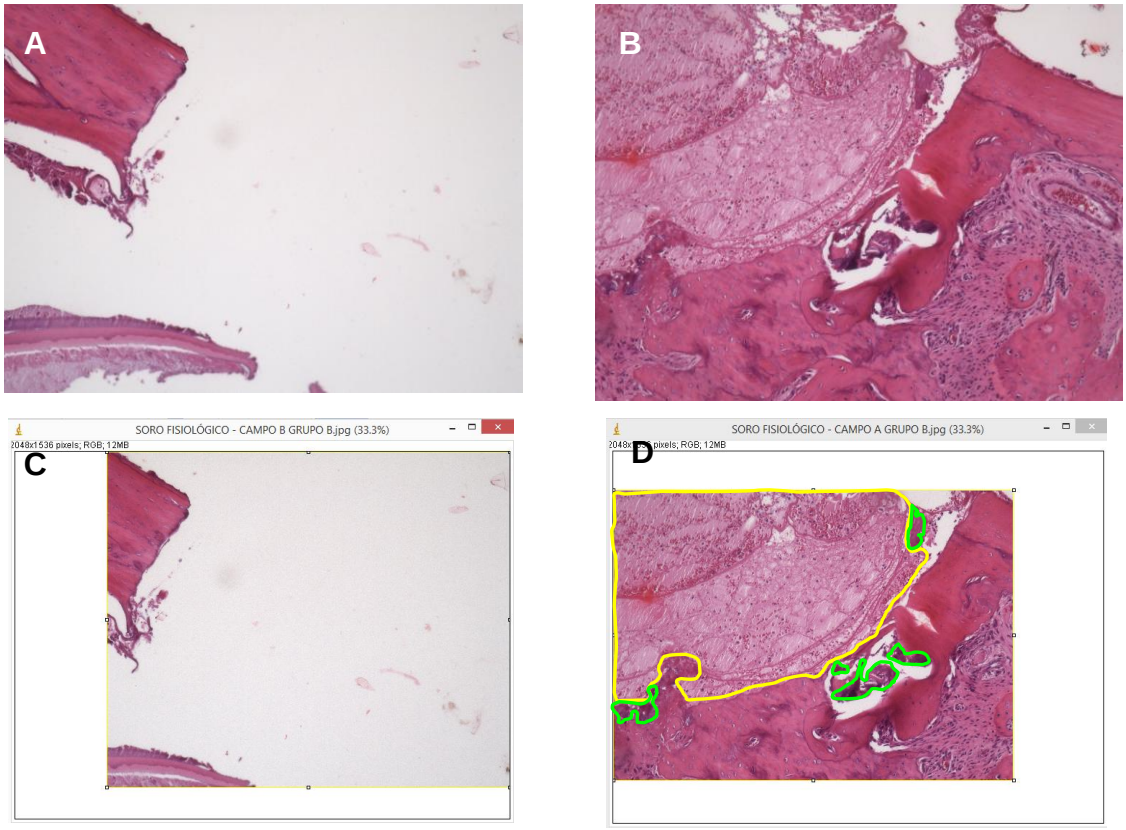


Tabela 4.2 – Grupo B. Em relação à aplicação da solução de Carnoy (**CARNOY**) e do soro fisiológico 0,9% (**SORO**), os pareamentos dos números 1 a 5 com seus respectivos cortes histológicos, corte 1 em azul, 2 em magenta e 3 em verde-claro, significam amostras obtidas do mesmo animal

AMOSTRA	Área do retângulo	Área de necrose	% Área de necrose	Área do coágulo	% Área de coágulo	AMOSTRA	Área do retângulo	Área de necrose	% Área de necrose	Área do coágulo	% Área de coágulo
1 - CARNOY						1 - SORO					
campoAcorte1	1651806	18131	1,09764706	1158562	70,13910835	campoAcorte1	793548	0	0	0	0
campoBcorte1	2150928	0	0	1223403	56,87791502	campoBcorte1	1777845	0	0	1245648	70,06505067
campoAcorte2	1915200	147085	7,679876775	857125	44,75381161	campoAcorte2	722394	0	0	0	0
campoBcorte2	2179956	55685	2,554409355	1309948	60,09057064	campoBcorte2	1631256	0	0	1228626	75,31779193
campoAcorte3	1836000	42536	2,316775599	1225875	66,76879085	campoAcorte3	738720	0	0	0	0
campoBcorte3	1872000	91255	4,874732906	1148205	61,33573718	campoBcorte3	1670334	0	0	1772298	106,1044079
2 - CARNOY						2 - SORO					
campoAcorte1	2037600	0	0	21942	1,076855124	campoAcorte1	2136528	0	0	792489	37,09237604
campoBcorte1	2129520	0	0	144980	6,808106991	campoBcorte1	1534716	0	0	280231	18,2594695
campoAcorte2	1981341		0	56799	2,866694829	campoAcorte2	1987200	31570	1,588667472	629594	31,68246779
campoBcorte2	2369952	13059	0,551023818	165068	6,965035579	campoBcorte2	1483266	3267	0,220257189	248331	16,74217571
campoAcorte3	1815327	0	0	91645	5,048401748	campoAcorte3	2159946	34566	1,600317786	612000	28,33404168
campoBcorte3	2293437	22237	0,969592799	28855	1,258155336	campoBcorte3	1477044	3802	0,257406008	178335	12,07377708
3 - CARNOY						3 - SORO					
campoAcorte1	1838592	5105	0,277658121	317742	17,2818113	campoAcorte1	2042955	42974	2,103521615	347340	17,00184292
campoBcorte1	2406918	0	0	0	0	campoBcorte1	1917600	5623	0,293231122	0	0
campoAcorte2	1386531	30571	2,204855138	0	0	campoAcorte2	2324259	30322	1,304587828	935397	40,24495549
campoBcorte2	1595184	0	0	0	0	campoBcorte2	1207608	7013	0,580734808	345187	28,5843585
campoAcorte3	1146231	57060	4,978054162	0	0	campoAcorte3	1988064	24014	1,2079088	824520	41,47351393
campoBcorte3	1548705	0	0	0	0	campoBcorte3	1621065	17625	1,087248198	168882	10,41796597
4 - CARNOY						4 - SORO					
campoAcorte1	674154	0	0	86586	12,84365293	campoAcorte1	1181160	0	0	24945	2,111906939
campoBcorte1	1619232	6278	0,38771467	105222	6,498265845	campoBcorte1	2150400	0	0	701695	32,63090588
campoAcorte2	820080	28158	3,433567457	70510	8,597941664	campoAcorte2	1146112	0	0	0	0
campoBcorte2	1594596	6688	0,419416579	152681	9,574901731	campoBcorte2	2426880	24565	1,012204971	621040	25,59005802
campoAcorte3	1513890	40622	2,683286104	183271	12,10596543	campoAcorte3	1253556	0	0	0	0
campoBcorte3	1904349	4862	0,255310345	93998	4,935964994	campoBcorte3	2773032	7089	0,255640757	446373	16,09692928
5 - CARNOY						5 - SORO					
campoAcorte1	1152333	6943	0,602516807	0	0	campoAcorte1	2010960	64829	3,223783666	956760	47,57727652
campoBcorte1	1598190	0	0	0	0	campoBcorte1	1928400	0	0	23772	1,232731798
campoAcorte2	1224000	3585	0,292892157	25845	2,111519608	campoAcorte2	1601568	57836	3,611211013	679926	42,45377031
campoBcorte2	1289610	0	0	0	0	campoBcorte2	1580154	2097	0,132708584	19575	1,238803307
campoAcorte3	1638045	48058	2,933863233	0	0	campoAcorte3	2106000	0	0	164814	7,825925926
campoBcorte3	1581870	0	0	0	0	campoBcorte3	2106453	51348	2,4376523	707375	33,58133317

4.3.3 Grupo C

Somente a neoformação óssea foi quantificada nesse grupo (Figura 4.11 – A, B, C e D; Figura 4.12 - A, B, C e D e Tabela 4.3) e foi aplicado o Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon para verificar se o soro fisiológico 0,9% promoveu mais neoformação óssea do que a solução de Carnoy. O valor de p <0,05 significa que houve uma diferença estatisticamente significante entre a substância teste e a controle.

Figura 4.11 – Solução de Carnoy Grupo C (HE com magnificação 10x). Campo B (A), Campo A (B), área retangular da Fig. 4.11 – A. A neoformação óssea está contornada em branco (C) e área retangular da Fig. 4.11 – B. A neoformação óssea está contornada em branco (D)

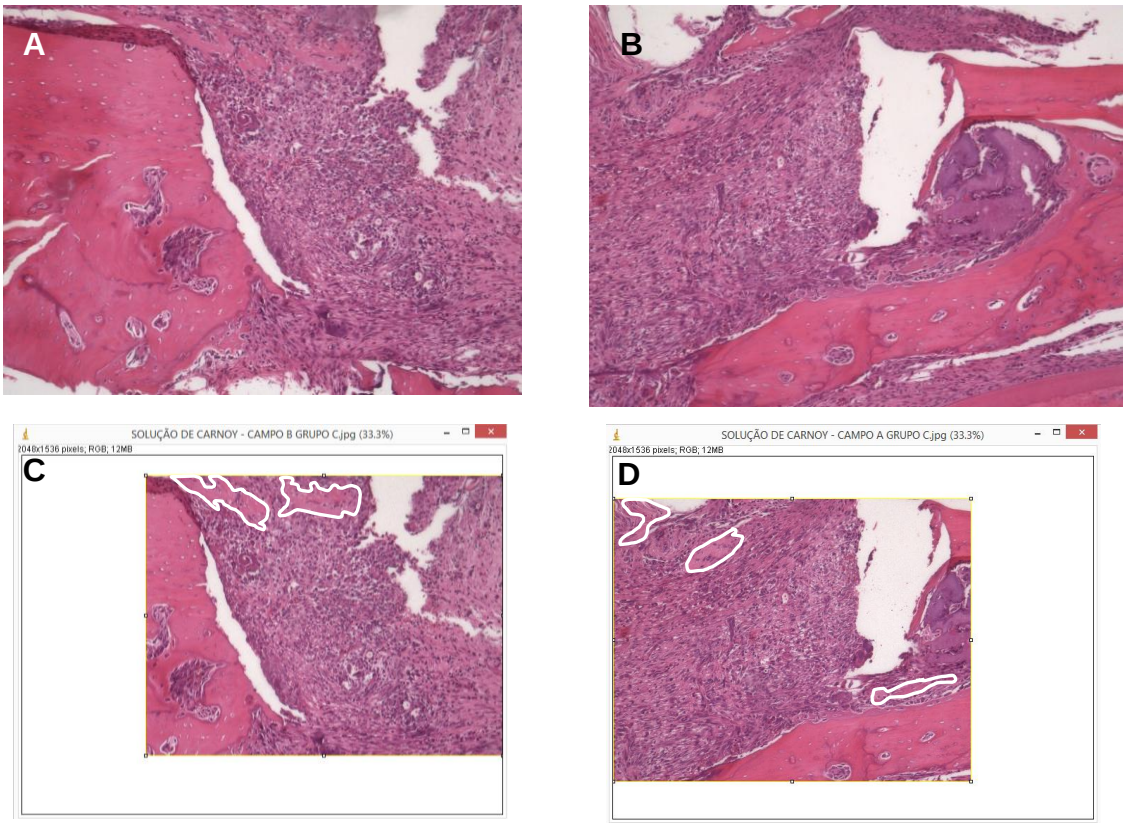


Figura 4.12 – Soro fisiológico 0,9% Grupo C (HE com magnificação 10x). Campo B (A), Campo A (B), área retangular da Fig. 4.12 – A. A neoformação óssea está contornada em branco (C) e área retangular da Fig. 4.12 – B. Nesta área não ocorreu neoformação óssea (D)

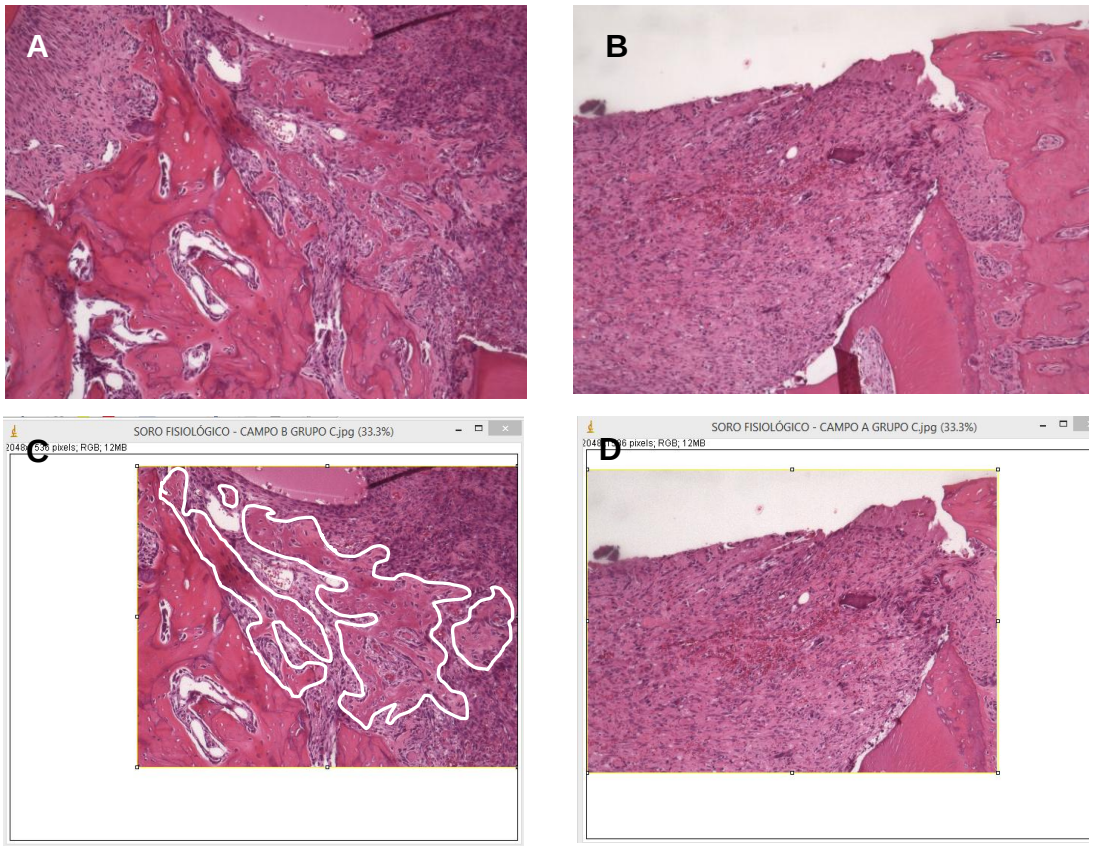


Tabela 4.3 – Grupo C. Em relação à aplicação da solução de Carnoy (**CARNOY**) e do soro fisiológico 0,9% (**SORO**), os pareamentos dos números 1 a 5 com seus respectivos cortes histológicos, corte 1 em azul, 2 em magenta e 3 em verde-claro, significam amostras obtidas do mesmo animal

AMOSTRA	Área do retângulo	Área de osso neoformado	% Osso neoformado	AMOSTRA	Área do retângulo	Área de osso neoformado	% Osso neoformado
1 - CARNOY				1 -SORO			
campoAcorte1	2250000	0	0	campoAcorte1	1838700	58127	3,161309621
campoBcorte1	1173822	0	0	campoBcorte1	2213010	349474	15,79179489
campoAcorte2	1667295	0	0	campoAcorte2	2039085	85868	4,21110449
campoBcorte2	710619	0	0	campoBcorte2	1325655	0	0
campoAcorte3	2221200	0	0	campoAcorte3	2030400	122376	6,027186761
campoBcorte3	850752	0	0	campoBcorte3	1379661	0	0
2 - CARNOY				2 -SORO			
campoAcorte1	1887507	8781	0,465216818	campoAcorte1	1872000	0	0
campoBcorte1	1526046	18300	1,199177482	campoBcorte1	1655304	0	0
campoAcorte2	1962000	14238	0,725688073	campoAcorte2	1908000	62015	3,250262055
campoBcorte2	1485390	25581	1,722173975	campoBcorte2	1509510	0	0
campoAcorte3	1782000	15260	0,85634119	campoAcorte3	2005200	27854	1,38908837
campoBcorte3	1515540	26085	1,721168692	campoBcorte3	1375746	0	0
3 - CARNOY				3 - SORO			
campoAcorte1	1168830	7466	0,638758417	campoAcorte1	1875600	51300	2,73512476
campoBcorte1	1726800	26862	1,555594163	campoBcorte1	1676400	0	0
campoAcorte2	1164618	17035	1,462711378	campoAcorte2	1494126	181476	12,14596359
campoBcorte2	1731117	46706	2,698026765	campoBcorte2	1766400	0	0
campoAcorte3	1063179	59928	5,636680183	campoAcorte3	1670967	156194	9,347521525
campoBcorte3	1822266	72191	3,961606044	campoBcorte3	1516908	0	0
4 - CARNOY				4 -SORO			
campoAcorte1	1944000	493049	25,36260288	campoAcorte1	1554102	17588	1,131714649
campoBcorte1	1833804	0	0	campoBcorte1	1635363	0	0
campoAcorte2	1864800	482410	25,86926212	campoAcorte2	936000	0	0
campoBcorte2	1905624	26254	1,377711448	campoBcorte2	1653345	0	0
campoAcorte3	1588410	0	0	campoAcorte3	931635	0	0
campoBcorte3	698649	0	0	campoBcorte3	1471938	0	0
5 - CARNOY				5 -SORO			
campoAcorte1	2044080	96672	4,7293648	campoAcorte1	2131200	0	0
campoBcorte1	1780800	502876	28,23876909	campoBcorte1	1791600	424985	23,72097566
campoAcorte2	2038068	202202	9,921258761	campoAcorte2	1583640	268122	16,93074184
campoBcorte2	1831200	404472	22,08781127	campoBcorte2	2022000	0	0
campoAcorte3	2053215	83690	4,07604659	campoAcorte3	1644282	0	0
campoBcorte3	1708800	387875	22,69867743	campoBcorte3	1917600	57071	2,976168127

4.3.4 Análise histomorfológica dos grupos A, B e C

A análise histomorfológica foi realizada de maneira global nos cortes histológicos de todas as amostras (amostras de 1 a 5) e os parâmetros avaliados foram a quantidade de necrose óssea, coágulo sanguíneo, infiltrado inflamatório, tecido de granulação e osso neoformado. Para cada parâmetro, foi atribuída uma nota de 0 a 4, sendo 0 = ausente, 1 = discreto, 2 = moderado, 3 = intenso e 4 = muito intenso (Tabela 4.4). Foi aplicado o Teste de Mann-Whitney para verificar se houve diferença entre os parâmetros avaliados para a solução de Carnoy e o soro

fisiológico 0,9%. O valor de p <0,05 significa que houve uma diferença estatisticamente significante entre a substância teste e a controle.

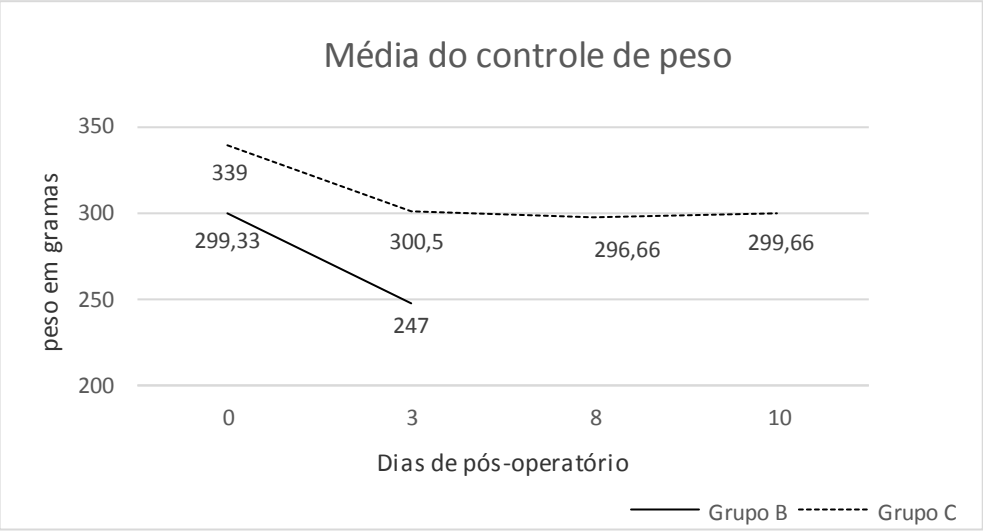
Tabela 4.4 - Análise histomorfológica dos grupos A, B e C

GRUPO A (CARNOY)	necrose	coágulo	infiltrado inflamatório	tec. de granulaçao	osso neoformado	GRUPO A (SORO)	necrose	coágulo	infiltrado inflamatório	tec. de granulaçao	osso neoformado
1 -CARNOY	1	1	0	0	0	1 -SORO	1	0	0	0	0
2 - CARNOY	2	0	0	0	0	2 -SORO	1	0	0	0	0
3 - CARNOY	1	1	0	0	0	3 - SORO	1	0	0	0	0
4 -CARNOY	1	1	0	0	0	4 - SORO	0	0	0	0	0
5 - CARNOY	1	0	0	0	0	5 -SORO	1	0	0	0	0
GRUPO B (CARNOY)						GRUPO B (SORO)					
1 - CARNOY	4	4	4	0	0	1 -SORO	2	4	4	0	0
2 - CARNOY	2	3	1	0	0	2 -SORO	2	3	1	0	0
3 - CARNOY	1	0	1	0	0	3 -SORO	1	2	1	0	0
4 - CARNOY	3	2	1	0	0	4 -SORO	3	3	4	0	0
5 - CARNOY	1	1	1	0	0	5 -SORO	3	3	2	0	0
GRUPO C (CARNOY)						GRUPO C (SORO)					
1 - CARNOY	3	0	4	4	2	1 -SORO	1	0	1	4	3
2 - CARNOY	1	0	1	4	1	2 -SORO	2	1	2	3	1
3- CARNOY	1	1	2	3	1	3 -SORO	0	0	1	4	2
4 - CARNOY	1	1	1	4	2	4 -SORO	2	1	0	0	0
5 - CARNOY	1	1	1	3	2	5 -SORO	1	0	1	4	2

5 RESULTADOS

Nenhum rato foi a óbito no momento intra-operatório e pós-operatório. Os animais do grupo B e C perderam peso, sendo que os animais do grupo C ganharam peso do 8º ao 10º dia de pós-operatório (Gráfico 5.1). Não ocorreu infecção das feridas operatórias em nenhum animal.

Gráfico 5.1 – Média do controle de peso pós-operatório dos animais dos B e C



5.1 GRUPO A

Foi confrontada a quantidade de osteonecrose dos campos A e B dos cortes histológicos 1, 2 e 3 das cinco amostras da SC e SF. Imediatamente após sua aplicação, a solução de Carnoy não provocou mais osteonecrose na superfície do leito ósseo do que o soro fisiológico; ou seja, não houve diferença estatisticamente significante entre a substância teste e controle (Tabelas 5.1 e 5.2).

Tabela 5.1 – Comparação referente à quantidade de osteonecrose provocada pela solução de Carnoy (SC) e pelo soro fisiológico 0,9% (SF) do grupo A

Amostra	Corte	Campo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50 (Mediana)	Percentil 75	Sig. (p)
SC	1	A	5	0,06%	0,14%	0,00%	0,32%	0,00%	0,00%	0,16%	0,068
SF				0,50%	0,69%	0,00%	1,54%	0,01%	0,06%	1,22%	
SC		B		0,06%	0,14%	0,00%	0,31%	0,00%	0,00%	0,16%	0,593
SF				0,16%	0,28%	0,00%	0,64%	0,00%	0,00%	0,40%	
SC	2	A		0,18%	0,40%	0,00%	0,90%	0,00%	0,00%	0,45%	1,000
SF				0,16%	0,27%	0,00%	0,63%	0,00%	0,05%	0,39%	
SC		B		0,75%	1,36%	0,00%	3,14%	0,00%	0,00%	1,86%	0,465
SF				0,16%	0,25%	0,00%	0,58%	0,00%	0,00%	0,41%	
SC	3	A		0,03%	0,05%	0,00%	0,10%	0,00%	0,00%	0,08%	0,109
SF				0,27%	0,35%	0,00%	0,79%	0,00%	0,11%	0,63%	
SC		B		0,16%	0,36%	0,00%	0,82%	0,00%	0,00%	0,41%	0,593
SF				0,30%	0,42%	0,00%	0,89%	0,00%	0,00%	0,74%	

Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon. O valor de $p<0,05$ aponta para uma diferença estatisticamente significante entre as substâncias

Tabela 5.2 – Representação estatística da análise histomorfológica quanto à necrose causada pela solução de Carnoy (SC) e pelo soro fisiológico 0,9% (SF) do grupo A

Amostra	parâmetro	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50	Percentil 75	Sig. (p)
SC	necrose	5	1,2	0,45	1	2	1	1	1,5	0,157
SF			0,8	0,45	0	1	0,5	1	1	

Teste de Mann-Whitney. O valor de $p <0,05$ aponta para uma diferença estatisticamente significante entre as substâncias. A SC não provocou mais necrose no leito ósseo do que o SF imediatamente após a aplicação das substâncias

5.2 GRUPO B

Foi confrontada a quantidade de osteonecrose e de coágulo sanguíneo dos campos A e B dos cortes histológicos 1, 2 e 3 das cinco amostras da SC e SF. Três dias após sua aplicação, a solução de Carnoy não provocou mais osteonecrose na superfície do leito ósseo do que o soro fisiológico; ou seja, não houve diferença estatisticamente significante entre a substância teste e controle (Tabelas 5.3).

Tabela 5.3 – Comparação referente à quantidade de osteonecrose provocada pela solução de Carnoy (SC) e pelo soro fisiológico 0,9% (SF) do grupo B

Amostra	Corte	Campo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50 (Mediana)	Percentil 75	Sig. (p)
SC	1	A	5	0,40%	0,46%	0,00%	1,10%	0,00%	0,28%	0,85%	0,285
SF				1,07%	1,51%	0,00%	3,22%	0,00%	0,00%	2,66%	
SC		B		0,08%	0,17%	0,00%	0,39%	0,00%	0,00%	0,19%	0,655
SF				0,06%	0,13%	0,00%	0,29%	0,00%	0,00%	0,15%	
SC	2	A		2,72%	3,11%	0,00%	7,68%	0,15%	2,20%	5,56%	0,5
SF				1,30%	1,48%	0,00%	3,61%	0,00%	1,30%	2,60%	
SC		B		0,71%	1,06%	0,00%	2,55%	0,00%	0,42%	1,55%	0,893
SF				0,39%	0,41%	0,00%	1,01%	0,07%	0,22%	0,80%	
SC	3	A		2,58%	1,78%	0,00%	4,98%	1,16%	2,68%	3,96%	0,08
SF				0,56%	0,78%	0,00%	1,60%	0,00%	0,00%	1,40%	
SC		B		1,22%	2,08%	0,00%	4,87%	0,00%	0,26%	2,92%	0,893
SF				0,81%	1,00%	0,00%	2,44%	0,13%	0,26%	1,76%	

Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon. O valor de p<0,05 aponta para uma diferença estatisticamente significante entre as substâncias

Contudo, em duas comparações, houve mais formação de coágulo sanguíneo após a aplicação do soro fisiológico 0,9% do que após a aplicação da solução de Carnoy (campos B dos cortes histológicos 2 e 3); ou seja, nesses dois casos houve diferença estatisticamente significante entre a substância teste e controle (Tabela 5.4). A Tabela 5.5 demonstra os resultados da avaliação histomorfológica entre a SC e o SF.

Tabela 5.4 – Comparação referente à quantidade de coágulo sanguíneo dentro do defeito ósseo monocortical após a aplicação da solução de Carnoy (SC) e do soro fisiológico 0,9% (SF) do grupo B

Amostra	Corte	Campo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50 (Mediana)	Percentil 75	Sig. (p)
SC	1	A	5	20,27%	28,85%	0,00%	70,14%	0,54%	12,84%	43,71%	0,893
SF				20,76%	21,09%	0,00%	47,58%	1,06%	17,00%	42,33%	
SC		B		14,04%	24,18%	0,00%	56,88%	0,00%	6,50%	31,84%	0,068
SF				24,44%	28,82%	0,00%	70,07%	0,62%	18,26%	51,35%	
SC	2	A		11,67%	18,77%	0,00%	44,75%	1,06%	2,87%	26,68%	0,686
SF				22,88%	21,27%	0,00%	42,45%	0,00%	31,68%	41,35%	
SC		B		15,33%	25,38%	0,00%	60,09%	0,00%	6,97%	34,83%	0,043
SF				29,49%	27,73%	1,24%	75,32%	8,99%	25,59%	51,95%	
SC	3	A		16,78%	28,38%	0,00%	66,77%	0,00%	5,05%	39,44%	0,893
SF				15,53%	18,57%	0,00%	41,47%	0,00%	7,83%	34,90%	
SC		B		13,51%	26,81%	0,00%	61,34%	0,00%	1,26%	33,14%	0,043
SF				35,65%	40,44%	10,42%	106,10%	11,25%	16,10%	69,84%	

Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon. O valor de p<0,05 aponta para uma diferença estatisticamente significante entre as substâncias

Tabela 5.5 – Representação estatística da análise histomorfológica quanto à quantidade de necrose e coágulo sanguíneo após a aplicação da solução de Carnoy (SC) e do soro fisiológico 0,9% (SF) do grupo B

Amostra	parâmetro	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50 (Mediana)	Percentil 75	Sig. (p)
SC	necrose	5	2,2	1,3	1	4	1	2	3,5	1,000
SF			2,2	0,84	1	3	1,5	2	3	
SC	coágulo		2	1,58	0	4	0,5	2	3,5	0,102
SF			3	0,71	2	4	2,5	3	3,5	

Teste de Mann-Whitney. O valor de p <0,05 aponta para uma diferença estatisticamente significante entre as substâncias. Não houve diferença significante de necrose e coágulo sanguíneo entre a SC e o SF três dias após sua aplicação

5.3 GRUPOS A e B

Com o Teste de Mann-Whitney pudemos verificar em qual grupo, A ou B, ocorreu mais osteonecrose após a aplicação da solução de Carnoy, mas não houve diferença estatisticamente significante entre eles (Tabela 5.6). Também não ocorreu mais osteonecrose para a solução de Carnoy e o soro fisiológico do grupo B em relação ao soro fisiológico do grupo A (Tabelas 5.7 e 5.8).

Tabela 5.6 – Comparação referente à quantidade de osteonecrose provocada pela solução de Carnoy entre os grupos A e B

Amostra	Corte	Campo	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50 (Mediana)	Percentil 75	Sig. (p)
solução de Carnoy	1	A	A	5	0,06%	0,14%	0,00%	0,32%	0,00%	0,00%	0,16%	0,196
			B		0,40%	0,46%	0,00%	1,10%	0,00%	0,28%	0,85%	
			total	10	0,23%	0,37%	0,00%	1,10%	0,00%	0,00%	0,39%	
		B	A	5	0,06%	0,14%	0,00%	0,31%	0,00%	0,00%	0,16%	0,881
			B		0,08%	0,17%	0,00%	0,39%	0,00%	0,00%	0,19%	
			total	10	0,07%	0,15%	0,00%	0,39%	0,00%	0,00%	0,08%	
	2	A	A	5	0,18%	0,40%	0,00%	0,90%	0,00%	0,00%	0,45%	0,058
			B		2,72%	3,11%	0,00%	7,68%	0,15%	2,20%	5,56%	
			total	10	1,45%	2,48%	0,00%	7,68%	0,00%	0,15%	2,51%	
		B	A	5	0,75%	1,36%	0,00%	3,14%	0,00%	0,00%	1,86%	0,911
			B		0,71%	1,06%	0,00%	2,55%	0,00%	0,42%	1,55%	
			total	10	0,73%	1,15%	0,00%	3,14%	0,00%	0,21%	1,08%	
	3	A	A	5	0,03%	0,05%	0,00%	0,10%	0,00%	0,00%	0,08%	0,052
			B		2,58%	1,78%	0,00%	4,98%	1,16%	2,68%	3,96%	
			total	10	1,31%	1,79%	0,00%	4,98%	0,00%	0,08%	2,75%	
		B	A	5	0,16%	0,36%	0,00%	0,82%	0,00%	0,00%	0,41%	0,196
			B		1,22%	2,08%	0,00%	4,87%	0,00%	0,26%	2,92%	
			total	10	0,69%	1,51%	0,00%	4,87%	0,00%	0,00%	0,85%	

Teste de Mann-Whitney. O valor de p <0,05 aponta para uma diferença estatisticamente significante entre as substâncias

Tabela 5.7 – Comparação referente à quantidade de osteonecrose provocada pelo soro fisiológico 0,9% entre os grupos A e B

Amostra	Corte	Campo	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50 (Mediana)	Percentil 75	Sig. (p)
soro fisiológico 0,9%	1	A	A	5	0,50%	0,69%	0,00%	1,54%	0,01%	0,06%	1,22%	0,829
			B		1,07%	1,51%	0,00%	3,22%	0,00%	0,00%	2,66%	
			total	10	0,78%	1,15%	0,00%	3,22%	0,00%	0,04%	1,68%	
		B	A	5	0,16%	0,28%	0,00%	0,64%	0,00%	0,00%	0,40%	0,521
			B		0,06%	0,13%	0,00%	0,29%	0,00%	0,00%	0,15%	
			total	10	0,11%	0,21%	0,00%	0,64%	0,00%	0,00%	0,19%	
	2	A	A	5	0,16%	0,27%	0,00%	0,63%	0,00%	0,05%	0,39%	0,332
			B		1,30%	1,48%	0,00%	3,61%	0,00%	1,30%	2,60%	
			total	10	0,73%	1,17%	0,00%	3,61%	0,00%	0,10%	1,38%	
		B	A	5	0,16%	0,25%	0,00%	0,58%	0,00%	0,00%	0,41%	0,281
			B		0,39%	0,41%	0,00%	1,01%	0,07%	0,22%	0,80%	
			total	10	0,28%	0,34%	0,00%	1,01%	0,00%	0,18%	0,58%	
	3	A	A	5	0,27%	0,35%	0,00%	0,79%	0,00%	0,11%	0,63%	0,911
			B		0,56%	0,78%	0,00%	1,60%	0,00%	0,00%	1,40%	
			total	10	0,42%	0,59%	0,00%	1,60%	0,00%	0,06%	0,89%	
		B	A	5	0,30%	0,42%	0,00%	0,89%	0,00%	0,00%	0,74%	0,281
			B		0,81%	1,00%	0,00%	2,44%	0,13%	0,26%	1,76%	
			total	10	0,55%	0,77%	0,00%	2,44%	0,00%	0,26%	0,94%	

Teste de Mann-Whitney. O valor de p <0,05 aponta para uma diferença estatisticamente significante entre as substâncias

Tabela 5.8 – Comparação referente à quantidade de osteonecrose provocada pela solução de Carnoy do grupo B com o soro fisiológico 0,9% do grupo A

Corte	Campo	Amostra	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50 (Mediana)	Percentil 75	Sig. (p)
1	A	SF	A	5	0,50%	0,69%	0,00%	1,54%	0,01%	0,06%	1,22%	0,751
		SC	B		0,40%	0,46%	0,00%	1,10%	0,00%	0,28%	0,85%	
		total		10	0,45%	0,56%	0,00%	1,54%	0,00%	0,17%	0,94%	
	B	SF	A	5	0,16%	0,28%	0,00%	0,64%	0,00%	0,00%	0,40%	0,521
		SC	B		0,08%	0,17%	0,00%	0,39%	0,00%	0,00%	0,19%	
		total		10	0,12%	0,22%	0,00%	0,64%	0,00%	0,00%	0,21%	
2	A	SF	A	5	0,16%	0,27%	0,00%	0,63%	0,00%	0,05%	0,39%	0,113
		SC	B		2,72%	3,11%	0,00%	7,68%	0,15%	2,20%	5,56%	
		total		10	1,44%	2,48%	0,00%	7,68%	0,00%	0,22%	2,51%	
	B	SF	A	5	0,16%	0,25%	0,00%	0,58%	0,00%	0,00%	0,41%	0,435
		SC	B		0,71%	1,06%	0,00%	2,55%	0,00%	0,42%	1,55%	
		total		10	0,43%	0,78%	0,00%	2,55%	0,00%	0,12%	0,56%	
3	A	SF	A	5	0,27%	0,35%	0,00%	0,79%	0,00%	0,11%	0,63%	0,072
		SC	B		2,58%	1,78%	0,00%	4,98%	1,16%	2,68%	3,96%	
		total		10	1,43%	1,71%	0,00%	4,98%	0,00%	0,63%	2,75%	
	B	SF	A	5	0,30%	0,42%	0,00%	0,89%	0,00%	0,00%	0,74%	0,435
		SC	B		1,22%	2,08%	0,00%	4,87%	0,00%	0,26%	2,92%	
		total		10	0,76%	1,50%	0,00%	4,87%	0,00%	0,13%	0,91%	

Teste de Mann-Whitney. O valor de p <0,05 aponta para uma diferença estatisticamente significante entre as substâncias

A análise histomorfológica também não demonstrou ocorrer mais necrose entre o grupo A e B após a aplicação da solução de Carnoy (Tabela 5.9); em contrapartida, a solução de Carnoy e o soro fisiológico do grupo B causaram mais

necrose, coágulo e infiltrado inflamatório que o soro fisiológico do grupo A (Tabelas 5.10 e 5.11).

Tabela 5.9 – Representação estatística da análise histomorfológica quanto à quantidade de necrose, coágulo sanguíneo, infiltrado inflamatório, tecido de granulação e osso neoformado após a aplicação da solução de Carnoy entre os grupos A e B

Amostra	parâmetro	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50	Percentil 75	Sig. (p)
Solução de Carnoy	necrose	A	5	1,2	0,45	1	2	1	1	1,5	0,156
		B		2,2	1,3	1	4	1	2	3,5	
		Total	10	1,7	1,06	1	4	1	1	2,25	
	coágulo	A	5	0,6	0,55	0	1	0	1	1	0,126
		B		2	1,58	0	4	0,5	2	3,5	
		Total	10	1,3	1,34	0	4	0	1	2,25	
	infiltrado inflamatório	A	5	0	0	0	0	0	0	0	0,004
		B		1,6	1,34	1	4	1	1	2,5	
		Total	10	0,8	1,23	0	4	0	0,5	1	
	tecido de granulação	A	5	0	0	0	0	0	0	0	1,000
		B		0	0	0	0	0	0	0	
		Total	10	0	0	0	0	0	0	0	
	osso neoformado	A	5	0	0	0	0	0	0	0	1,000
		B		0	0	0	0	0	0	0	
		Total	10	0	0	0	0	0	0	0	

Teste de Mann-Whitney. O valor de p <0,05 aponta para uma diferença estatisticamente significante entre as substâncias. Somente o infiltrado inflamatório foi maior para o grupo B quando comparado com o grupo A

Tabela 5.10 – Representação estatística da análise histomorfológica quanto à quantidade de necrose, coágulo sanguíneo e infiltrado inflamatório após a aplicação da solução de Carnoy (SC) do grupo B e do soro fisiológico (SF) do grupo A

parâmetro	Amostra	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50	Percentil 75	Sig. (p)
necrose	SF	A	5	0,8	0,45	0	1	0,5	1	1	0,045
	SC	B		2,2	1,3	1	4	1	2	3,5	
	Total		10	1,5	1,18	0	4	1	1	2,25	
coágulo	SF	A	5	0	0	0	0	0	0	0	0,019
	SC	B		2	1,58	0	4	0,5	2	3,5	
	Total		10	1	1,49	0	4	0	0	2,25	
infiltrado inflamatório	SF	A	5	0	0	0	0	0	0	0	0,004
	SC	B		1,6	1,34	1	4	1	1	2,5	
	Total		10	0,8	1,23	0	4	0	0,5	1	

Teste de Mann-Whitney. O valor de p <0,05 aponta para uma diferença estatisticamente significante entre as substâncias. Ocorreu mais necrose, coágulo e infiltrado inflamatório para a solução de Carnoy do grupo B do que para o soro fisiológico do grupo A

Tabela 5.11 – Representação estatística da análise histomorfológica quanto à quantidade de necrose, coágulo sanguíneo e infiltrado inflamatório após a aplicação do soro fisiológico 0,9% (SF) entre os grupos A e B

parâmetro	Amostra	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50 (M	Percentil 75	Sig. (p)
necrose	SF	A	5	0,8	0,45	0	1	0,5	1	1	0,018
		B		2,2	0,84	1	3	1,5	2	3	
	total		10	1,5	0,97	0	3	1	1	2,25	
coágulo	SF	A	5	0	0	0	0	0	0	0	0,005
		B		3	0,71	2	4	2,5	3	3,5	
	total		10	1,5	1,65	0	4	0	1	3	
infiltrado inflamatório	SF	A	5	0	0	0	0	0	0	0	0,005
		B		2,4	1,52	1	4	1	2	4	
	total		10	1,2	1,62	0	4	0	0,5	2,5	

Teste de Mann-Whitney. O valor de p <0,05 aponta para uma diferença estatisticamente significante entre as substâncias. Ocorreu mais necrose, coágulo e infiltrado inflamatório para a soro fisiológico do grupo B do que para o soro fisiológico do grupo A

5.4 GRUPO C

Foi confrontada a quantidade de neoformação óssea dos campos A e B dos cortes histológicos 1, 2 e 3 das cinco amostras da SC e SF. Dez dias após a aplicação da substância teste e controle, não houve diferença estatisticamente significante com relação à quantidade de neoformação óssea entre as substâncias (Tabelas 5.12 e 5.13).

Tabela 5.12 – Comparação referente à quantidade de neoformação óssea após a aplicação da solução de Carnoy (SC) e do soro fisiológico 0,9% (SF) do grupo C

Amostra	Corte	Campo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50 (Mediana)	Percentil 75	Sig. (p)
SC	1	A	5	6,24%	10,86%	0,00%	25,36%	0,23%	0,64%	15,05%	0,5
SF				1,41%	1,49%	0,00%	3,16%	0,00%	1,13%	2,95%	
SC		B		6,20%	12,34%	0,00%	28,24%	0,00%	1,20%	14,90%	0,715
SF				7,90%	11,18%	0,00%	23,72%	0,00%	0,00%	19,76%	
SC	2	A		7,60%	10,98%	0,00%	25,87%	0,36%	1,46%	17,90%	0,5
SF				7,31%	6,99%	0,00%	16,93%	1,63%	4,21%	14,54%	
SC		B		5,58%	9,28%	0,00%	22,09%	0,69%	1,72%	12,39%	0,068
SF				0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
SC	3	A		2,11%	2,59%	0,00%	5,64%	0,00%	0,86%	4,86%	0,465
SF				3,35%	4,17%	0,00%	9,35%	0,00%	1,39%	7,69%	
SC		B		5,68%	9,65%	0,00%	22,70%	0,00%	1,72%	13,33%	0,109
SF				0,60%	1,33%	0,00%	2,98%	0,00%	0,00%	1,49%	

Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon. O valor de p<0,05 aponta para uma diferença estatisticamente significante entre as substâncias

Tabela 5.13 – Representação estatística da análise histomorfológica quanto à quantidade de tecido de granulação e neoformação óssea dentro do defeito ósseo monocortical após a aplicação da solução de Carnoy (SC) e do soro fisiológico 0,9% (SF) do grupo C

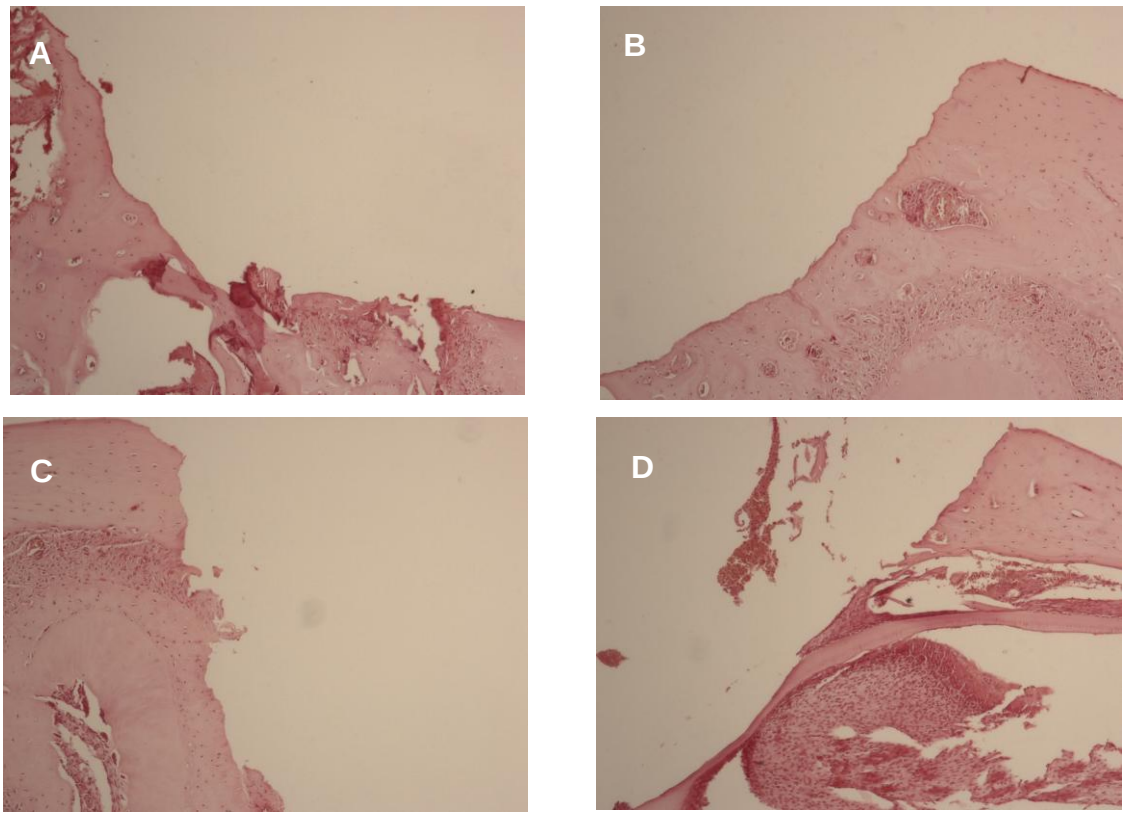
Amostra	parâmetro	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50 (	Percentil 75	Sig. (p)
SC	tecido de granulação	5	3,6	0,55	3	4	3	4	4	0,705
SF			3	1,73	0	4	1,5	4	4	
SC	osso neoformado		1,6	0,55	1	2	1	2	2	1,000
SF			1,6	1,14	0	3	0,5	2	2,5	

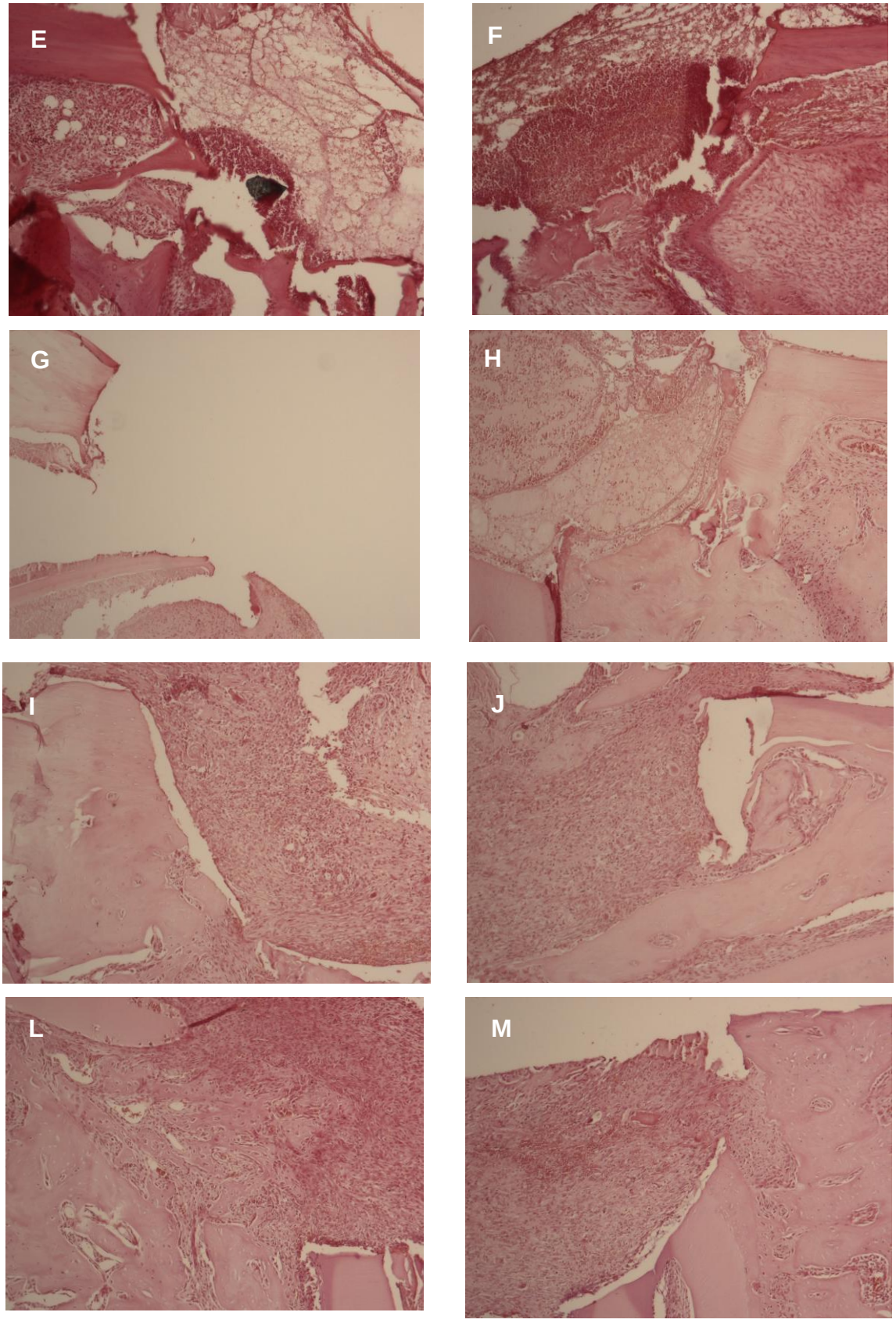
Teste de Mann-Whitney. O valor de p <0,05 aponta para uma diferença estatisticamente significante entre as substâncias. Não houve diferença com relação à quantidade de neoformação óssea entre as substâncias

5.5 COLORAÇÃO COM AZUL DA PRÚSSIA

Nenhuma amostra demonstrou possuir pigmentações azuis semelhantes à Figura 4.6 (Figura 5.1 A até M).

Figura 5.1 - Cortes análogos aos corados com HE, só que corados com Azul da Prússia e contracoloração de Carmalumen de Mayer (magnificação 10x)





Observe que não houve pigmentação azulada dos compostos férricos em nenhum deles. Figura 4.7 – A (A), figura 4.7 – B (B), figura 4.8 – A (C), figura 4.8 – B (D), figura 4.9 – A (E), figura 4.9 – B (F), figura 4.10 – A (G), figura 4.10 – B (H), figura 4.11 – A (I), figura 4.11 – B (J), figura 4.12 – A (L) e figura 4.12 – B (M)

6 DISCUSSÃO

Como a região posterior da mandíbula é o local mais acometido por cistos e tumores odontogênicos, elaboramos a criação de um defeito ósseo monocortical nos animais que permitisse a aplicação da SC em uma região semelhante. É fundamental que o operador esteja calibrado no momento da perfuração da cortical vestibular, pois qualquer descuido pode comprometer o limite do defeito em profundidade e perfurar as raízes dos molares e incisivo inferior que, por sua vez, permitirá a proliferação do tecido pulpar desses dentes para dentro do defeito, comprometendo as análises histológicas.

Ainda há muita controvérsia sobre o uso da solução de Carnoy após a enucleação ou curetagem dos cistos e tumores odontogênicos. Muitos profissionais que a utilizam, levam consigo uma filosofia empírica transmitida pelos mais experientes, que, por sua vez, basearam-se na sua percepção individual de um número maior de pacientes livres de recidivas se comparado aos que não receberam esse tratamento coadjuvante, também conhecido como curetagem química. As informações oriundas da literatura reforçam essa filosofia e fortalecem o uso da solução (Blanas et al., 2000). Não obstante sua eficácia clínica, os efeitos colaterais em tecidos expostos no campo operatório geram temor aos cirurgiões ou, simplesmente, àqueles que precisam de uma prova para usá-la. Quando Cutler e Zollinger (1933) aplicaram-na internamente aos astrocitomas cerebelares, obtendo hemostasia e enrijecendo-os para removê-los mais facilmente, isso interessou muito os cirurgiões buco-maxilo-faciais, dada a frequente característica friável das lesões que incidem na sua área de atuação; contudo, caso esse conceito seja seguido à risca, a SC deve ser aplicada internamente ao cisto ou tumor (Gosau et al., 2010). Um minuto de aplicação da SC dentro do cisto ou tumor pode ser o mínimo suficiente para tornar sua exérese mais fácil (Cutler; Zollinger, 1933). Gosau et al. (2010), instilam-na dentro do TOQ por 3 minutos e procedem com a enucleação, mas é uma técnica que deve ser desencorajada por causa da possibilidade de provocar danos às células do revestimento cístico ou tumoral, impossibilitando ou prejudicando a avaliação histológica do espécime (Pitak-Arnnop, 2010). Mesmo com um diagnóstico assegurado previamente à cirurgia, alguns cistos e tumores podem compartilhar diferentes tipos de células ao

longo de todo seu epitélio e/ou ectomesênquima odontogênico. Por essas razões, é praticamente unânime que a solução seja aplicada no osso após a remoção total da lesão. Novamente, foi Voorsmit[4] (1984 apud Stoelinga; Bronkhorst, 1988) que embasou seu uso sobre o osso e relatou que ossos cadavéricos expostos à SC durantes 5 minutos sofreram uma osteonecrose de 1,54 mm de profundidade; tal conceito é positivo, pois existem alguns cistos e tumores que são localmente infiltrativos e, a depender da sua localização, fica difícil visualizar toda sua remoção (Stoelinga, 2001). Nesses casos, o uso da solução está muito bem indicado, mesmo que exames de imagem pré-operatórios ditem a posição dessas infiltrações e fenestrações ósseas. Por outro lado, há uma resposta diferente entre um osso cadavérico e um viável. Existe aí, uma lacuna que precisava ser testada para novamente trazer à luz a questão dos efeitos da solução de Carnoy sobre o tecido ósseo, só que desta vez, de uma perspectiva histológica obtida de um modelo *in vivo*. Pois bem, os resultados do presente trabalho contradizem o que se acredita que ocorra com o uso da solução de Carnoy. Mesmo não avaliando a profundidade da osteonecrose, em nenhum momento sua quantidade foi maior após a aplicação sobre o osso da SC do a aplicação do SF, que é uma substância inerte. O fato de a análise histomorfológica demonstrar que a SC do grupo B provocou mais necrose no leito ósseo que o SF do grupo A é irrelevante, pois o SF do grupo B assim também o fez. Além do mais, o ideal seria a observação de uma osteonecrose imediatamente após sua aplicação (grupo A), pois fragmentos necróticos presentes dias após a cirurgia podem ser atribuídos à própria fisiologia da reparação do tecido ósseo. Outro resultado que embasa a ideia de que não ocorreu uma osteonecrose no leito ósseo após a aplicação da solução de Carnoy, foi o fato de não terem sido observadas pigmentações azuis na sua superfície após a coloração dos cortes com Azul da Prússia. Porém, não podemos afirmar com certeza se realmente não ocorreu a penetração e distribuição do cloreto férrico da SC no osso ou se alguma etapa do preparo das amostras como, por exemplo, na descalcificação em EDTA 4,13%, interferiu na permanência desse composto férrico no osso.

Paralelamente, outros estudos investigaram os efeitos da SC sobre os nervos. Como alguns cistos e tumores benignos envolvem essas estruturas, é muito

[4] Voorsmit RACA. The incredible keratocyst [thesis]. University of Nijmegen, 1984.

comum que, na cirurgia, nervos sensitivos sejam expostos no campo operatório; é um momento crítico, pois surge a seguinte dúvida: vale a pena aplicar a solução nas paredes da cavidade óssea e correr o risco de lesar quimicamente o(s) nervo(s) expostos na tentativa de assegurar uma menor possibilidade de recidiva, ou será que a solução não deve ser aplicada para preservá-los, mas correr um maior risco de o paciente vir a desenvolver uma recidiva, geralmente mais agressiva? Para responder a essa questão, o tempo de aplicação da solução deve ser levado em consideração e para quem a utiliza, talvez esse seja o aspecto mais controverso.

Três minutos é o tempo máximo de contato entre a SC e o nervo alveolar inferior de coelho sem que haja alterações sensoriais; contudo, pode ocorrer diminuição parcial da sensibilidade. O nervo alveolar inferior de humano pode tolerar a SC de maneira semelhante à dos coelhos em um tempo superior a 3 minutos, por causa da espessura das camadas perineurais (Frerich et al., 1994). Nervos safenos de ratos sofrem bloqueio da condução nervosa e danos apreciáveis após 2 minutos de exposição à SC, ratificando a influência do porte da superfície nervosa frente aos efeitos deletérios da solução (Loescher; Robinson, 1998). Extrapolando à prática clínica os resultados aqui obtidos, levando em consideração somente os efeitos positivos que a solução causaria sobre o tecido ósseo, a relação risco-benefício nos permite assegurar que não vale a pena utilizá-la se estruturas nervosas estiverem expostas no campo operatório, ainda que a parestesia gerada pelos danos da aplicação da solução de Carnoy aos nervo sensitivos também possa ocorrer por causa do próprio trauma operatório e os pacientes tendem a retornar ao seu estado de normalidade de 1 dia a 6 meses após a cirurgia; alterações residuais de sensibilidade podem não afetar a vida dos pacientes (Ribeiro Junior et al., 2012).

O temor quanto ao uso da solução de Carnoy não gira somente em torno de seus efeitos deletérios sobre os nervos periféricos. Vasos sanguíneos de ratos Wistar expostos à SC sofrem hialinização após 2 minutos e trombo venoso com perda focal da camada túnica após 5 minutos de exposição à solução, mas esse quadro tende a regredir no pós-operatório de 3 semanas (Saulacic et al., 2009); essa melhora no padrão histológico dos vasos é fundamental para a regeneração do defeito ósseo após ablação da lesão. Estruturas vasculares de humanos expostas no campo operatório, intraósseas ou não, também, supostamente,

podem sofrer esses mesmos danos se entrarem em contato com a SC. Observamos que nos animais do grupo B, a formação do coágulo sanguíneo foi mais abundante em dois defeitos ósseos monocorticais que receberam a aplicação do SF em comparação com seu par, que recebeu a aplicação da SC. Isso significa que sua utilização pode ter prejudicado a qualidade do aporte sanguíneo para dentro da cavidade criada cirurgicamente; contudo, isso não parece ter impedido a futura proliferação do tecido de granulação e neoformação óssea.

Essas informações nos permitem supor que o feixe vasculo-nervoso apical das raízes dentárias também pode ser danificado pela solução de Carnoy, acarretando em perda da vitalidade pulpar; muito embora ela deva ser usada com cautela nessa região, a proximidade de raízes dentárias ao cisto ou tumor pode facilitar as recidivas por dois motivos: dificuldade de visualização direta do campo operatório e presença de epitélio lesional na sua superfície. O padrão histológico de invasão mural do AU também pode determinar sua recidiva pois a osteonecrose causada pela SC pode não ser suficiente para alcançar as células tumorais infiltradas nos tecidos e estudos futuros são necessários para determinar a profundidade de infiltração desses tumores e o tempo adequado de aplicação da solução de Carnoy no intuito de promover uma margem de segurança suficiente após sua remoção (Lee et al., 2004). Recomenda-se que a solução não seja utilizada na intimidade dos seios maxilares, órbitas, paredes laterais da fossa nasal, proximidades da fossa pterigopalatina dentre outras estruturas porque poderia causar danos iatrogênicos nessas regiões. Em outros locais de tecido ósseo que surtiram dúvidas quanto a efetividade da remoção da lesão, principalmente do TOQ, ela pode ser aplicada seletivamente (Voorsmit et al., 1981) ou ao longo de todo o leito por 3 minutos (Blanas et al., 2000; Ribeiro Júnior et al., 2012; Rajeshkumar et al., 2013), embora esse tempo não esteja de acordo com a proposta original de curetagem química que, teoricamente, só é possível com uma aplicação de 5 minutos da solução (Stoelinga; Bronkhorst, 1988). Na verdade, o temor quanto ao tempo crítico de exposição das estruturas nobres à solução fez com que muitos trabalhos orientassem aplicar a SC por 3 minutos e parece que a redução de 2 minutos da proposta original não comprometeu a eficácia clínica da solução em evitar recidivas (Stoelinga, 2005); há ainda os que preferem ter o cuidado a mais de proteger o nervo com substâncias semissólidas (Williams; Connor Jr, 1994).

O osso medular da tíbia de ratos Wistar exposto à SC por 3 minutos demonstrou infiltrado inflamatório composto por células polimorfonucleadas 24 horas e células mononucleadas 7 dias após sua aplicação, semelhantemente ao grupo controle (aplicação de solução salina por 3 minutos); contudo, o processo de neoformação óssea no 14º, 30º, 60º e 90º dia após a aplicação da solução de Carnoy foi mais lento (Takahashi, 2008). Esses resultados não estão concordes com os nossos, pois não houve diferença estatisticamente significante entre a quantidade de neoformação óssea 10 dias após a aplicação da SC e SF; ou seja, ela não comprometeu o reparo da cavidade óssea nem quantitativamente, nem qualitativamente.

É prematuro afirmar que a solução de Carnoy não possui efeito benéfico como tratamento coadjuvante dos cistos e tumores odontogênicos. O acompanhamento a longo prazo dos pacientes que receberam sua aplicação prova que quando ela foi utilizada ocorreram menos recidivas se comparados aos pacientes que receberam enucleação e curetagem somente. Ela tem um efetivo poder fixativo dos tecidos moles (Dias et al., 2016). Remanescentes epiteliais ou cistos satélites do TOQ que passaram desapercebidos aos olhos do cirurgião após a curetagem da lesão, sua presença em fenestrações ósseas e aderida na mucosa oral, proximidade do cisto ou tumor ao cemento radicular onde o cirurgião não consegue enxergar, podem ser inativados pelo uso da SC. Resta-nos saber qual o seu real poder sobre o epitélio odontogênico que é o precursor dos cistos e tumores odontogênicos dos maxilares. Talvez aí esteja a resposta para sua eficácia.

7 CONCLUSÃO

Frente aos nossos resultados, concluímos que:

- Imediatamente após a aplicação da solução de Carnoy e do soro fisiológico 0,9%, não houve diferença estatisticamente significante na quantidade de osteonecrose provocada no leito ósseo da mandíbula dos ratos Wistar;
- Três dias após a aplicação da solução de Carnoy, houve menor formação de coágulo sanguíneo dentro do defeito ósseo realizado na mandíbula dos ratos Wistar se comparado ao seu controle;
- Dez dias após a aplicação da solução de Carnoy e do soro fisiológico 0,9%, não houve diferença estatisticamente significante na quantidade de neoformação óssea dentro do defeito ósseo realizado na mandíbula dos ratos Wistar.

REFERÊNCIAS[5]

Blanas N, Freund B, Schwartz M, Furst IM. Systematic review of the treatment and prognosis of the odontogenic keratocyst. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2000 Nov;90(5):553-8.

Brasil. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1° do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 09 de outubro de 2008, p. 1.

Brasil. Resolução-RDC. No - 3, de 26 de janeiro de 2015. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 de janeiro de 2015. Seção 1, p. 53.

Chin VK, Shinagawa A, Naclério-Homem Mda G. Bone healing of mandibular critical-size defects in spontaneously hypertensive rats. Braz Oral Res. 2013 Sep-Oct;27(5):423-30. doi: 10.1590/S1806-83242013000500006.

Cutler EC, Zollinger R. Sclerosing solutions in the treatment of cysts and fistulae. The Am J Surg. 1933; 19:411-8.

Dias AR, Pereira MA, Mello ES, Zilberstein B, Cecconello I, Ribeiro Junior U. Carnoy's solution increases the number of examined lymph nodes following gastrectomy for adenocarcinoma: a randomized trial. Gastric Cancer. 2016 Jan;19(1):136-42. doi: 10.1007/s10120-014-0443-2.

[5] De acordo com Estilo Vancouver.

Ebenezer V, Ramalingam B. Importance of different modalities of treatment for the management of keratocystic odontogenic tumour with five year follow-up. J Clin Diagn Res. 2014 Mar;8(3):225-8. doi: 10.7860/JCDR/2014/7486.4168.

Frerich B, Cornelius CP, Wiethölter H. Critical time of exposure of the rabbit inferior alveolar nerve to Carnoy's solution. J Oral Maxillofac Surg. 1994 Jun;52(6):599-606.

Gosau M, Draenert FG, Müller S, Frerich B, Bürgers R, Reichert TE, Driemel O. Two modifications in the treatment of keratocystic odontogenic tumors (KCOT) and the use of Carnoy's solution (CS)--a retrospective study lasting between 2 and 10 years. Clin Oral Investig. 2010 Feb;14(1):27-34. doi: 10.1007/s00784-009-0264-6.

Korhonen LK, Lindholm K. Effect of histological fixation on carbohydrate-rich tissue compounds and their periodate consumption. Histochemie. 1969 Apr 17;18(1):87-96.

Lee PK, Samman N, Ng IO. Unicystic ameloblastoma--use of Carnoy's solution after enucleation. Int J Oral Maxillofac Surg. 2004 Apr;33(3):263-7.

Loescher AR, Robinson PP. The effect of surgical medicaments on peripheral nerve function. Br J Oral Maxillofac Surg. 1998 Oct; 36(5):327-32.

Pereira MA, Dias AR, Faraj SF, Cirqueira Cdos S, Tomitao MT, Nahas SC, Ribeiro U Jr, de Mello ES. Carnoy's solution is an adequate tissue fixative for routine surgical pathology, preserving cell morphology and molecular integrity. Histopathology. 2015 Feb;66(3):388-97. doi: 10.1111/his.12532.

Pitak-Arnnop P. Enucleation of keratocystic odontogenic tumours: study interpretation, technical refinement and future research. Clin Oral Investig. 2010 Dec;14(6):719-21. doi: 10.1007/s00784-010-0465-z.

Puts JJ, Voorsmit RA, van Haelst UJ. Sialocystadenoma papilliferum of the palate. J Maxillofac Surg. 1984 Apr;12(2):90-4.

Rajeshkumar BP, Rai KK, Geetha NT, Shivakumar HR, Upasi AP. Carnoy's in Aggressive Lesions: Our Experience. J Maxillofac Oral Surg. 2013 Mar;12(1):42-7. doi: 10.1007/s12663-012-0371-9.

Rao K, Kumar S. The Use of Enucleation and Chemical Cauterization (Carnoy's) in the Management of Odontogenic Keratocyst of the Jaws. Indian J Otolaryngol Head Neck Surg. 2014 Jan;66(1):8-12. doi: 10.1007/s12070-012-0523-8.

Ribeiro Junior O, Borba AM, Alves CA, de Gouveia MM, Coracin FL, Guimarães Júnior J. Keratocystic odontogenic tumors and Carnoy's solution: results and complications assessment. Oral Dis. 2012 Sep;18(6):548-57. doi: 10.1111/j.1601-0825.2012.01907.x.

Saulacic N, Stajcic Z, Stojcev Stajcic Lj, Piattelli A, Iizuka T, Lombardi T. Effects of Carnoy's solution on blood vessels of the axillary fossa of rats. Int J Oral Maxillofac Surg. 2009 Aug;38(8):876-9. doi: 10.1016/j.ijom.2009.04.001.

Senese F. What are some common reactions of iron and its compounds? Citado em: 14 jul 2016. Disponível em: http://antoine.frostburg.edu/chem/senese/101/inorganic/faq/iron-reactions.shtml. Última revisão em 15 de fevereiro de 2010.

Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. Nat Protoc. 2012 Oct;7(10):1918-29. doi: 10.1038/nprot.2012.113.

Stoelinga PJ. Long-term follow-up on keratocysts treated according to a defined protocol. Int J Oral Maxillofac Surg. 2001 Feb;30(1):14-25.

Stoelinga PJ. The treatment of odontogenic keratocysts by excision of the overlying, attached mucosa, enucleation, and treatment of the bony defect with carnoy solution. J Oral Maxillofac Surg. 2005 Nov;63(11):1662-6.

Stoelinga PJ, Bronkhorst FB. The incidence, multiple presentation and recurrence of aggressive cysts of the jaws. J Craniomaxillofac Surg. 1988 May;16(4):184-95.

Stoelinga PJ, Peters JH. A note on the origin of keratocysts of the jaws. Int J Oral Surg. 1973;2(2):37-44.

Takahashi A. Efeitos da solução de Carnoy no reparo ósseo em cavidades experimentais em tíbias de ratos [tese] [Internet]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, 2008 [citado 26 jun 2016]. Disponível em: http://repositorio.pucrs.br/dspace/handle/10923/477.

Voorsmit RA, Stoelinga PJ, van Haelst UJ. The management of keratocysts. J Maxillofac Surg. 1981 Nov;9(4):228-36.

Williams TP, Connor FA Jr. Surgical management of the odontogenic keratocyst: aggressive approach. J Oral Maxillofac Surg. 1994 Sep;52(9):964-6.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Fundada em 1900
"Em constante busca da excelência"

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Tel. (11) 3091 7842
ceuafo@usp.br

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **001/2015** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Profa. Dra. **Maria da Graça Naclério Homem,** Coordenadora da Linha de Pesquisa "**Análise histológica mediata e imediata dos efeitos da solução de Carnoy sobre o tecido ósseo da mandíbula de ratos**" do qual participa o pesquisador **Yuri Slusarenko da Silva,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **23/03/2015**, com validade de **03 (três)** anos.

São Paulo, 25 de março de 2015.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Coordenador do CEUA-FOUSP