

Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira

**ARRANJO DAS FIBRAS GENGIVAIS TRANSEPTAIS DE RATOS WISTAR:
ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO E HISTOQUÍMICO.**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde do Programa de Pós-Graduação em Saúde: área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Saúde.

Orientador: Prof.Dr. Robert Willer Farinazzo Vitral

Co-orientadora: Prof^ª Dra. Vera Maria Peters

JUIZ DE FORA

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Oliveira, Roberto Sotto-Maior Fortes de.

Arranjo das fibras gengivais transeptais de ratos wistar: estudo histomorfométrico e histoquímico / Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira. – 2010.

107 f. : il.

Tese (Doutorado em Saúde)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

1. Gengiva. I. Título.

CDU 616.311.2

ROBERTO SOTTO-MAIOR FORTES DE OLIVEIRA

**ARRANJO DAS FIBRAS GENGIVAIS TRANSEPTAIS DE RATOS WISTAR:
ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO E HISTOQUÍMICO.**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde do Programa de Pós-Graduação em Saúde: área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Saúde.

Aprovado em 03 de fevereiro de 2010.

Banca examinadora:

Prof.Dr. Robert Willer Farinazzo Vitral (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a.Dr^a. Vera Maria Peters (Co-orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a.Dr^a. Martha de Oliveira Guerra
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof.Dr. Alexandre Ferreira Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof.Dr. Alexandre de Albuquerque Franco
Associação Brasileira de Odontologia - Aracajú - SE

Prof.Dr. Antônio-Carlos Guimarães de Almeida
Universidade Federal de São João del'Rei

À Beatriz, minha esposa, e à Clara minha filha, por serem a essência da motivação que me impulsionou durante toda minha dedicação e esforço na condução desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. Robert Willer Farinazzo Vitral pela grande oportunidade concedida a mim ao aceitar ser meu orientador e abrir as portas do Programa de Pós-Graduação em Saúde.

À Prof^a.Dr^a. Vera Maria Peters pela co-orientação e por ter me recebido de portas abertas no CBR.

À Prof^a.Dr^a. Martha de Oliveira Guerra pela co-orientação (extra-oficial) e pelos grandes momentos de convívio científico.

A toda minha família, meus pais José e Zuleika, minhas irmãs Adriana e Sônia, meus sobrinhos Álvaro, Elisa, Gabriel, Lucas, Maria Júlia, minha tia Lourdes e tio Milton (in memorian), tios e tias, meus sogros André, e Lucrécia, meus cunhados Ary, José Cláudio e Francisco e cunhadas Lívia e Karla pelo apoio incondicional.

À Beatriz, minha esposa, meu amor, te amo!

À Clara, minha filha, alegria da minha vida, te amo!

A todos os amigos, bolsistas, professores, funcionários do CBR e Biotério pelos grandes momentos de convívio e pelo grande zelo prestado a mim.

A todos que conviveram comigo durante o curso, colegas, amigos, professores, funcionários. A lista é grande demais para citar nomes, mas vocês foram fundamentais para meu crescimento. Todos moram no meu coração.

À FAPEMIG e à coordenação da Pós-Graduação em Saúde pelo suporte prestado.

RESUMO

As fibras transeptais situam-se na lâmina própria da gengiva entre dois dentes adjacentes. São comumente descritas como um grupo de fibras colágenas inseridas no cemento de um dente que seguem diretamente por sobre a crista óssea alveolar inserindo-se em uma região correspondente no cemento do dente adjacente. De maneira distinta, relatou-se na literatura que as fibras transeptais não são contínuas ao longo de toda sua extensão; são originadas dos dentes adjacentes, entrelaçando-se na região central do espaço interproximal. Com o presente estudo, objetivou-se avaliar e quantificar o arranjo das fibras gengivais transeptais empregando-se análise histomorfométrica e histoquímica em cortes histológicos sagitais da região entre primeiro e segundo molares da maxila de 12 ratos Wistar machos. As fibras colágenas foram coradas pelo método de picro-sirius e analisadas por microscopia de luz polarizada linear, processamento e análise digital de imagem baseados em métodos de filtragem e medição por transformada de Fourier. Foram realizadas medidas histomorfométricas de orientação, densidade e dimensão fractal das fibras. O brilho máximo apresentado pelas fibras foi mensurado pelo histograma de intensidade. Os parâmetros quantitativos foram comparados entre três regiões de interesse ao longo da extensão da gengiva interproximal ocupada pelas fibras transeptais utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida de testes post hoc de Bonferroni ou Tamhane T2. Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nos parâmetros de densidade de ocupação e dimensão fractal das fibras pertencentes à região central quando comparada às regiões próximas aos dentes, sem haver diferença na orientação e na intensidade de brilho das fibras. Os resultados demonstraram quantitativamente um arranjo mais denso de fibras na região central, reforçando o conceito de que as fibras transeptais entrelaçam-se nesta região.

Palavras-chave: Dimensão fractal. Gengiva. Fibras transeptais. Transformada de Fourier. Picro-sirius. Microscopia de luz polarizada.

ABSTRACT

The transeptal fibers are located in the lamina propria of the gingiva between adjacent teeth. They are often described as a group of collagen fibers embedded in the cementum of one tooth that follows a straight path over the alveolar bone crest and embeds itself in the cementum of the adjacent tooth. In a distinct way, it was reported in the literature that the transeptal fibers are not continuous over its full length but originates from the adjacent teeth interlacing in the central area of the interproximal gingiva. The present study aimed to evaluate and quantitate the gingival transseptal fibers arrangement by histomorphometry and histochemistry of sagittally cut tissue sections of the interdental region between first and second maxilar molar teeth of 12 male Wistar rat. The collagen fibers were stained with Picrosirius red staining and assessed with linear polarized light microscopy, digital image processing and analysis based on Fourier transform measurements and filtering techniques. Histomorphometrical parameters like fiber orientation, area fraction and fractal dimension were measured. The maximal brilliance presented by the fibers was evaluated using intensity histogram measurements. These quantitative parameters were compared among three different regions of interest along the length of the interdental gingiva using one-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's or Tamhane's T2 post hoc tests. There was an increase ($p < 0.05$) in area fraction and fractal dimension parameters in the central region compared to regions near the teeth, and no difference in the orientation and maximal brilliance of fibers among the three regions. Our results quantitative demonstrated a denser arrangement of the fibers in the central region reinforcing the model of an interlacement of the transseptal fibers in that region.

Key words: Gingiva. Fourier transform. Fractal dimension. Picrosirius red. Polarized light microscopy. Transseptal fibers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Microscopia de luz polarizada. Modificado e publicado com autorização de Michael W. Davidson, National High Magnetic Field Laboratory, The Florida State University - USA – Fonte: <http://www.microscopyu.com/articles/polarized/polarizedintro.html>, acessado em 03/01/201021
- Figura 2 Aspecto clínico intrabucal da maxila de rato Wistar31
- Figura 3 Avaliação radiográfica do ponto final de descalcificação de maxila de rato. (a) Tomada radiográfica da maxila de rato utilizando o posicionador acoplado à fonte de raios-x (b) Imagem radiográfica adquirida antes do início da descalcificação. (c) Imagem radiográfica intermediária. (d) Imagem radiográfica do ponto final de descalcificação da maxila32
- Figura 4 Corte histológico sagital da região transeptal entre o primeiro e segundo molares maxilares de rato Wistar corado com Hematoxilina e Eosina, microscopia de campo claro, 10X.....34
- Figura 5 Corte histológico sagital da região gengival interdental entre o primeiro e segundo molares maxilares de rato Wistar corado pelo picro-sirius e observado por microscopia de luz polarizada. (a) Posição de extinção da imagem das fibras transeptais, a linha tracejada representa a direção do trajeto das fibras. (b) Posição de brilho máximo das fibras. (c) Porção distal das fibras transeptais (t) e sua inserção no cimento (C)35
- Figura 6 Regiões de captura de imagem e avaliação37

Figura 7 (a) Imagem da janela de Hanning gerada pela macro “HanningWindow”. (b) Gráfico de superfície das intensidades geradas pela função janela de Hanning em (a).....	39
Figura 8 Método da transformada de Fourier usado para medir a orientação preferencial das fibras. (a) Imagem em tons de cinza de uma região das fibras transeptais capturada com objetiva de 40X. (b) Espectro de Fourier da imagem da Figura 4a. A circunferência mostra a região da medida das intensidades ao longo de seu raio entre 0° e 180° no sentido horário.(c) A posição do pico de intensidade máxima representa o eixo principal de orientação das fibras somado de 90°.	40
Figura 9 Processo de filtragem e segmentação. (a) Imagem das fibras transeptais capturada com objetiva 40X. (b) Imagem em tons de cinza do canal verde. (c) Imagem em tons de cinza do canal vermelho. (d) Espectro de Fourier da imagem da Figura 5c. (e) O resultado da multiplicação do espectro de Fourier pelo filtro direcional. (f) Imagem binária resultante do canal vermelho. (g) Imagem binária resultante do canal verde. (h) Máscara resultante da adição das imagens binárias dos canais vermelho e verde. (i) As fibras principais segmentadas após a aplicação da máscara sobre a imagem inicial da Figura 5a.....	43
Figura 10 Tela do programa Benoit 1.3. Observa-se a imagem da máscara binária das fibras e o gráfico de regressão linear e o valor da inclinação da reta de regressão após a seleção dos limites para cálculo representando o valor negativo da dimensão fractal	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 AS ESTRUTURAS DO PERIODONTO	13
2.2 AS FIBRAS TRANSEPTAIS.....	15
2.3 AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FIBRAS COLÁGENAS.....	19
2.4 AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DE FIBRAS COLÁGENAS.....	23
2.4.1 Análise de quantidade de colágeno e birrefringência	23
2.4.2 Análise de orientação de fibras	24
2.4.3 Análise fractal	25
3 HIPÓTESE	28
4 OBJETIVOS	29
4.1 OBJETIVO GERAL	29
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
5 MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1 ANIMAIS.....	30
5.2 COLETA DAS AMOSTRAS.....	30
5.3 PREPARO HISTOTÉCNICO, HISTOLÓGICO E HISTOQUÍMICO	31
5.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	33
5.5 ANÁLISE HISTOQUÍMICA E HISTOMORFOMÉTRICA.....	34
5.5.1 Microscopia de luz polarizada e captura digital de imagens	35
5.5.2 Processamento e análise das imagens	37
5.5.3 Medida da orientação das fibras	38
5.5.4 Densidade de ocupação das fibras	41
5.5.5 Dimensão Fractal	44
5.5.6 Medida da intensidade máxima de brilho das fibras	45

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
6 RESULTADOS.....	47
6.1 ARTIGOS PUBLICADOS	47
6.1.1 Artigo I - A reliable positioning device for dorsoventral cephalometric radiography of the rat	47
6.1.2 Artigo II - Determinação do ponto de descalcificação para o preparo histológico de tecidos mineralizados	48
6.2 CÓDIGOS DE SOFTWARE PUBLICADOS	49
6.2.1 Código I - Hanning Window	49
6.2.2 Código II - Directional Filter Window	50
6.3 REFORMULAÇÃO DE EQUAÇÃO MATEMÁTICA PUBLICADA EM LIVRO.....	51
6.3.1 Livro I - Fehler in Definition des Hanning-Fensters.....	51
6.3.2 Livro II - Error in equation for Hanning windowing function	52
6.4 ARTIGO PREPARADO PARA A PUBLICAÇÃO	53
6.4.1 Artigo - Histomorphometric analysis of the arrangement of transseptal fibers in rat gingiva	53
7 COMENTÁRIOS	54
8 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS.....	57
APÊNDICE	63

1 INTRODUÇÃO

As fibras transeptais pertencem a uma rede de feixes de fibras colágenas encontrada na lâmina própria da gengiva da região interdental (SCHROEDER; LISTGARTEN, 1997; NANCI, 2007).

Foram identificadas em várias espécies de mamíferos tais como macacos, cães, ratos e no homem, sendo comumente descritas como um grupo de fibras colágenas, localizado entre dentes adjacentes, que passam por sobre a crista óssea alveolar, com origem no cimento da raiz de um dente e inserção em uma região correspondente no cimento do dente adjacente. (GOLDMAN, 1951; BERNICK, 1960; SMUKLER; DREYER, 1969; PAGE *et al.*, 1974; SCHACTER; BERNICK, 1976; KUSTERS *et al.*, 1991; REDLICH *et al.*, 1996; NANCI, 2007).

Seu arranjo ultra-estrutural é descrito como feixes densos de fibras colágenas paralelas e bem organizadas compostos principalmente por fibras colágenas Tipo I e por finas fibras de colágeno tipo III distribuídas ao longo de toda a extensão (CHAVRIER *et al.*, 1984; REDLICH *et al.*, 1996). Devido a sua resistência à tração as fibras colágenas Tipo I permitem às fibras transeptais prover suporte estrutural (MONTES; JUNQUEIRA, 1982). Elas suportam a gengiva interdental, protegem o osso interproximal, estabilizam a posição dentária durante o uso e mantêm os dentes adjacentes em contato (GOLDMAN, 1951; HASSELL, 1993; THILANDER, 2000), além de participar dos processos de migração dentária fisiológica (PICTON; MOSS, 1973) e da recidiva de dentes movimentados ortodonticamente (NANCI, 2007).

De maneira distinta e pouco frequente, relatou-se na literatura que as fibras transeptais não são contínuas ao longo de toda sua extensão; são originadas dos

dentos adjacentes, entrelaçando-se na região central do espaço interproximal (BERNICK, 1960; FURSTMAN; BERNICK, 1972; SCHACTER; BERNICK, 1976).

Como somente descrições qualitativas histológicas ou ultra-estruturais do arranjo das fibras gengivais transeptais estão disponíveis na literatura (GOLDMAN, 1951; BERNICK, 1960; SMUKLER; DREYER, 1969; PAGE et al., 1974; SCHACTER; BERNICK, 1976; KUSTERS et al., 1991; REDLICH et al., 1996; NANJI, 2007), além de existir alguma divergência de opiniões quanto à sua organização estrutural, o presente estudo tem como objetivo avaliar e quantificar o arranjo das fibras transeptais gengivais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AS ESTRUTURAS DO PERIODONTO

Os dentes são suportados por estruturas teciduais que os envolvem e os sustentam. O conjunto destes tecidos é denominado de periodonto sendo o mesmo composto pelo osso alveolar, cemento radicular, ligamento periodontal e gengiva (FURSTMAN; BERNICK, 1972; HASSELL, 1993; CHO; GARANT, 2000).

Os processos alveolares da maxila e mandíbula formam e mantêm os alvéolos dentários. Estas estruturas são constituídas por tecido ósseo denominado de osso alveolar, o qual está em contato com o ligamento periodontal e possui a função de alojar as raízes absorvendo e distribuindo as forças geradas durante os contatos dos dentes e mastigação, transmitidas pelas fibras do ligamento periodontal (HEASMAN et al., 1996; LINDHE et al., 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

O cemento é um tecido mineralizado, avascular e sem inervação que recobre a superfície da raiz dos dentes. É responsável por manter a ancoragem das fibras do ligamento periodontal e de algumas fibras gengivais à superfície radicular contribuindo desta forma com a sustentação do dente (HASSELL, 1993; HEASMAN et al., 1996).

O ligamento periodontal situa-se entre a superfície radicular e o osso alveolar, é constituído de tecido conjuntivo fibroso cuja principal função é de sustentar o dente em seu alvéolo além de dissipar as forças de tensão e compressão geradas. Suas fibras colágenas ancoram-se tanto no cemento quanto no osso alveolar. A porção destas fibras que se encontram inseridas são denominadas fibras de Sharpey. O ligamento periodontal é contínuo ao tecido conjuntivo gengival na região cervical

sendo delimitado em relação à gengiva pelas fibras da crista alveolar (HEASMAN et al., 1996; CHO; GARANT, 2000; LINDHE et al., 2003; NANCI, 2007).

A gengiva é a porção da mucosa oral que recobre e se insere na região cervical dos dentes assim como na crista óssea e porção externa do osso alveolar adjacente (HEASMAN et al., 1996). Estruturalmente é composta de epitélio estratificado e tecido conjuntivo denso fibroso (SCHROEDER; LISTGARTEN, 1997).

O tipo de epitélio está relacionado à região anatômica coberta pela gengiva compreendendo o epitélio oral gengival (estratificado, escamoso, queratinizado; exposto á cavidade oral), o epitélio sulcular (estratificado, escamoso, não queratinizado ou para queratinizado; confronta-se com o dente sem manter contato com a superfície dentária) e o epitélio juncional (estratificado, escamoso e não queratinizado) (CHO; GARANT, 2000; LINDHE et al., 2003; NANCI, 2007). O epitélio juncional mantém uma conexão direta com a superfície dentária formando um colar que circunda os dentes com sua base seguindo apicalmente a junção amelo-cementária se estendendo até a margem gengival com sua superfície livre formando o fundo do sulco gengival (SCHROEDER; LISTGARTEN, 1997). A região gengival interdental pode ter um formato de uma depressão ou vale onde o epitélio juncional dos dentes adjacentes se unem para formar o revestimento da gengiva interdental denominada de área de *col* (LINDHE et al., 2003; NANCI, 2007).

O tecido conjuntivo, também denominado de lâmina própria, é o componente tecidual predominante da gengiva. As fibras colágenas representam aproximadamente 60% do volume do tecido conjuntivo gengival e são constituídas principalmente de colágeno Tipo I (90%) e de colágeno Tipo III (8%), e pequenas quantidades de colágeno tipo IV, V, VI e VIII (NARAYANAN; PAGE, 1983; CHAVRIER et al., 1984). Outros elementos são observados na lâmina própria como

os fibroblastos (aproximadamente 5%); macrófagos, leucócitos e mastócitos dentre outros (3%); sendo o restante ocupado por vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e substância fundamental, composta principalmente por glicoproteínas e proteoglicanas (HASSELL, 1993; LINDHE et al., 2003).

O colágeno gengival tem um alto grau de estruturação e é organizado em grupos de fibras com distinção estrutural e funcional sendo responsáveis pela resistência à tração, pelo suporte dos dentes e estabilidade da gengiva (GOLDMAN, 1951; ARNIM; HAGERMAN, 1953; PAGE *et al.*, 1974; NARAYANAN et al., 1980).

A análise ultra-estrutural do tecido conjuntivo usando marcação por imunoperoxidase em amostras de gengiva inserida humana revelou dois padrões de organização do colágeno gengival: Padrão I, vários feixes densos de fibras colágenas longas, espessas e em grande parte paralelas, compostos principalmente de fibras colágenas Tipo I interconectados por finas fibras de colágeno Tipo III; e Padrão II, fibras curtas e finas compondo uma delgada rede reticular, em um padrão misto de colágeno tipo I e III, localizada subjacente à membrana basal epitelial e em torno de vasos. O arranjo das fibras colágenas do padrão I confere resistência e rigidez ao tecido (CHAVRIER et al., 1984; REDLICH et al., 1996).

As fibras gengivais supra-alveolares formam uma densa rede de feixes de fibras colágenas organizados em grupos principais e secundários que variam tanto na orientação espacial quanto no tamanho (HASSELL, 1993). Elas são agrupadas de acordo com sua localização, origem e inserção (REDLICH, *et al.*, 1999). Foram identificados cinco grupos principais de fibras: fibras dento-gengivais, fibras dento-periostais, fibras alvéolo-gengivais, fibras circulares e fibras transeptais; e compõem os grupos secundários os feixes de fibras periósteo-gengival, interpapilar,

transgengival, intercircular, intergengival e semicircular (HASSELL, 1993; NANCI, 2007).

2.2 AS FIBRAS TRANSEPTAIS

Estudos histológicos dos tecidos periodontais identificaram e descreveram as fibras colágenas transeptais em várias espécies de mamíferos tais como cães (KUSTERS et al., 1991; REDLICH et al., 1996), humanos (GOLDMAN, 1951), macacos (SMUKLER; DREYER, 1969; PAGE et al., 1974; SCHACTER; BERNICK, 1976) e ratos (BERNICK, 1960).

Em um estudo histológico do arranjo das fibras gengivais do homem, Goldman (1951) descreve as fibras transeptais, coradas por Hematoxilina e Eosina, como um feixe de fibras que percorrem o espaço interproximal sobre a crista alveolar estando inseridas nos dentes adjacentes formando um grupo distinto que conecta um dente ao outro.

Bernick (1960) avaliou histologicamente a formação e organização das fibras transeptais em molares de ratos com idades entre 15 e 35 dias. Notou que estas fibras tornam-se organizadas somente após ambos os dentes adjacentes estarem em oclusão clínica. Observou que neste estágio as fibras de um dente dirigem-se em direção à região central do espaço interproximal ocorrendo uma interdigitação com as fibras originadas do cemento do dente adjacente. Comenta ainda que após os dentes alcançarem a oclusão funcional, as fibras tornam-se mais densas e o entrelaçamento de fibras parece tornar-se cimentado na região central dando uma aparência de que as fibras passam de um dente ao outro.

Smukler e Dreyer (1969) a partir de uma investigação histológica em macacos utilizando Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Masson e impregnação de prata, examinam a organização de fibras cemento-gengivais e observam um grupo de fibras que emergem do cemento coronalmente às fibras periodontais da crista alveolar. Observaram que estas fibras se irradiam a partir do cemento passando por sobre o osso alveolar e que aquelas que terminam no dente adjacente correspondem ao grupo das fibras transeptais e as outras continuam seu curso por sobre a crista alveolar entre o tecido ósseo e o epitélio gengival.

Furstman e Bernick (1972) descrevem vasos sanguíneos na região transeptal oriundos de um plexo formado de ramos originados de vasos da região do ligamento periodontal dos dentes adjacentes e de ramos dos vasos provenientes do septo alveolar de onde capilares se dirigem para a lâmina própria gengival terminando em aposição direta na lâmina basal do epitélio. Reforçam também a observação de que as fibras transeptais não se tornam organizadas enquanto os dentes adjacentes não alcançarem oclusão clínica e de que neste estágio as fibras partem de um dente em direção ao meio do espaço interproximal para se entrelaçar com as fibras que partem do cemento do dente adjacente.

Page *et al.* (1974) reavaliaram a arquitetura das fibras colágenas gengivais em um estudo histológico conduzido em tecidos gengivais provenientes de macacos. Verificaram que a maior parte do tecido conjuntivo gengival é composta de feixes de fibras colágenas altamente organizadas e de complexidade maior que o suposto até então. Classificaram os feixes da gengiva marginal em dois grandes grupos: o ligamento interdental e o ligamento gengival, descrevendo o ligamento interdental como sendo formado pelas fibras transeptais que se originam do cemento logo abaixo do epitélio juncional, atravessam por sobre o osso interproximal e se inserem

em uma região correspondente no dente adjacente. Como as fibras transeptais se estendem entre os dentes, elas formam um ligamento contínuo conectando todos os dentes de uma arcada dentária intacta. Descreveram ainda as fibras do ligamento interdental como sendo contíguas às fibras do ligamento periodontal e aos vários componentes do ligamento gengival.

Schacter e Bernick (1976) estudaram a histogênese das fibras supra-alveolares a partir de um estágio pré-eruptivo até a maturidade. Avaliaram cortes histológicos da maxila e mandíbula de macacos em diversas fases de desenvolvimento dentário abrangendo estágios de dentição mista em animais jovens, dentição permanentes em adultos jovens e também de animais adultos. Utilizaram cortes em planos sagitais méso-distal, buco-lingual e horizontal corados pelas técnicas para tecido conjuntivo de Mallory, hematoxilina férrica picro-fucsina, e pela impregnação de nitrato de prata. Concluíram que as fibras transeptais parecem desenvolver-se de maneira independente em cada um dos dentes e que suas terminações entrelaçam na porção média dando a impressão de que as fibras transeptais de um dente passam ininterruptamente ao cemento do dente adjacente quando os dois dentes já se encontram no estágio de oclusão clínica.

Em um estudo baseado em microscopia de campo claro e de polarização, investigou-se a organização das fibras transeptais em especial nos locais de inserção em dente de cães Beagles. Uma descrição qualitativa da organização das fibras foi baseada em secções histológicas horizontais da região interdental de três animais, onde as amostras foram coradas usando-se método tricrômico (Heidenhain's Azan) ou Hematoxilina e Eosina. As fibras transeptais foram descritas apresentando-se em densos feixes de fibras interconectando a menor distância entre dois dentes adjacentes com suas terminações inseridas no cemento. Este

arranjo foi observado independente à rotação dentária apresentada, significando que a formação das fibras transeptais e os locais de inserção são muito mais dependentes da posição dentária durante o desenvolvimento que de uma determinação anatômica (KUSTERS et al., 1991).

A ultra-estrutura das fibras transeptais gengivais foi avaliada em um estudo por meio de microscopia eletrônica de varredura de secções longitudinais da região gengival interdental de cães descrevendo-se densos feixes de fibras colágenas paralelas e bem organizadas interligados por fibras finas (REDLICH et al., 1996).

Trabalhos de revisão e livros textos descrevem as fibras transeptais como um grupo de feixes de fibras localizadas na porção supra-alveolar da região interdental, que se estendem entre dentes adjacentes passando direto sobre o septo ósseo alveolar se inserindo no cimento supra-alveolar (HASSELL, 1993; SCHROEDER; LISTGARTEN, 1997; NEWMAN et al., 2002; LINDHE et al., 2003).

Nanci (2007) descreve as fibras transeptais como parte de um sistema de fibras colágenas que formam coletivamente um ligamento interdental conectando todos os dentes do arco. Estas fibras são encontradas na lâmina própria da gengiva, localizado entre dentes adjacentes que passam por sobre a crista óssea alveolar, com origem no cimento da raiz de um dente logo abaixo à base do epitélio juncional e inserção em uma região correspondente do cimento do dente adjacente.

2.3 AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FIBRAS COLÁGENAS

A microscopia de luz polarizada tem sido usada em investigações qualitativas e quantitativas de estruturas relacionadas ao colágeno desde o nível molecular ao nível histomorfológico estrutural das fibras. Auxiliados por esta útil ferramenta de

microscopia, associados algumas vezes a métodos de coloração específicos ao colágeno e/ou ao processamento e análise digital de imagens, vários estudos histológicos e histomorfológicos foram conduzidos em tecidos saudáveis ou patológicos, identificando, visualizando ou medindo diferentes características do colágeno como: tipo, conteúdo de fibra, distribuição topográfica, orientação das fibras, processos de degradação e remodelamento (PUCHTLER et al., 1973; WHITTAKER et al., 1994; AROKOSKI *et al.*, 1996; KOREN et al., 2001; KOMATSU et al., 2002; GOLDMAN et al., 2003; RICH; WHITTAKER, 2005; BORGES et al., 2007).

Apesar das diferenças de metodologia e de objetivos, todos os estudos citados acima, basearam-se em uma propriedade óptica fundamental dos materiais anisotrópicos, a birrefringência.

Birrefringência é uma propriedade física dos materiais que refletem a luz polarizada em duas direções e é observada como uma imagem brilhante sob um fundo escuro em um microscópio de polarização (Figura 1), quando a substância birrefringente é colocada entre dois filtros cruzados, o polarizador e o analisador (WAYNE, 2009). É uma característica das fibras colágenas devido à sua anisotropia óptica causada pela disposição de maneira organizada e em orientações paralelas das moléculas de colágeno (JUNQUEIRA; MONTES, 1983; WHITTAKER et al., 1994; MONTES, 1996; BROMAGE et al., 2003). Esta propriedade anisotrópica é dependente do plano de secção, com a expressão mais forte resultando em máxima birrefringência quando as fibras são seccionadas longitudinalmente (PUCHTLER et al., 1973; WHITTAKER et al., 1994).

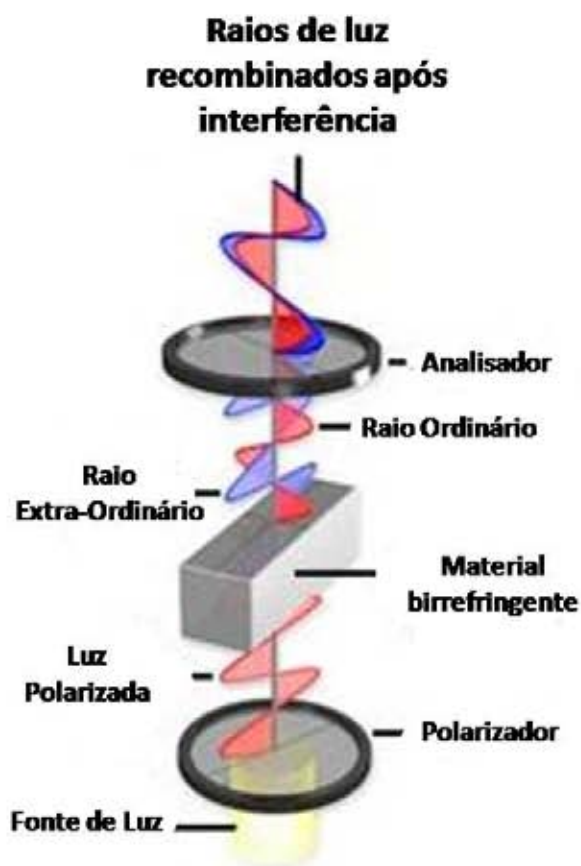


Figura 1 - Microscopia de luz polarizada. Modificado e publicado com autorização de Michael W. Davidson, National High Magnetic Field Laboratory, The Florida State University – USA. Fonte: <http://www.microscopyu.com/articles/polarized/polarizedintro.html>, acessado em 03/01/2010.

Outro fator influente na avaliação da birrefringência de espécimes anisotrópicos ao utilizar luz polarizada linear é sua orientação com o azimute de polarização fazendo-se necessário o ajuste de seu alinhamento mediante de uma platina rotatória do microscópio (WAYNE, 2009). Na microscopia de luz polarizada linear, o brilho das fibras colágenas é máximo quando elas estão alinhadas a 45° em relação à direção de propagação da luz (WHITTAKER et al., 1994).

Adicionalmente às considerações físicas, a birrefringência das fibras colágenas pode ser aumentada utilizando-se técnica histoquímica baseada no corante Sirius Red (MONTES; JUNQUEIRA, 1991; RICH; WHITTAKER, 2005).

Por possuírem grande quantidade de aminoácidos básicos em sua estrutura, as moléculas de colágeno reagem fortemente com corantes ácidos (MONTES; JUNQUEIRA, 1991). Sirius Red é um corante aniônico (KOREN et al., 2001), sua molécula é alongada e ao reagir com o colágeno promove um aumento de sua birrefringência normal devido a várias moléculas do corante alinharem-se paralelamente ao longo eixo de cada molécula do colágeno (MONTES; JUNQUEIRA, 1991; MONTES, 1996).

O Sirius Red cora o colágeno e não cora as proteoglicanas (JUNQUEIRA et al., 1979). O aumento da birrefringência promovido pelo método pico-sirius polarização é específico para o colágeno (JUNQUEIRA; MONTES, 1983).

Quando observadas sob luz polarizada as fibras colágenas coradas pelo pico-sirius apresentam diferentes cores de interferência e intensidade de birrefringência. O colágeno Tipo I apresenta-se como fibras espessas, fortemente birrefringentes, de cor amarela ou vermelha; enquanto o colágeno tipo III aparece sob a forma de fibras delgadas de cor esverdeadas e fracamente birrefringentes (JUNQUEIRA; MONTES, 1983).

A coloração histoquímica pela técnica de pico-sirius combinada com microscopia de luz polarizada é um método seletivo de detecção de colágeno usado na investigação de fibras colágenas em cortes histológicos (JUNQUEIRA et al., 1979; KOREN et al., 2001; BORGES et al., 2007), sendo mais específica que a microscopia de campo claro usando corantes tricrômicos ou hematoxilina e eosina,

neste último sem nenhuma especificidade ao colágeno (WHITTAKER et al., 1994; RICH; WHITTAKER, 2005).

2.4 AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DE FIBRAS COLÁGENAS

A quantificação de parâmetros histológicos de tecidos contendo colágeno utilizando microscopia e análise digital de imagens tem sido aplicada em diversos modelos.

2.4.1 **Análise de quantidade de colágeno e birrefringência**

Pickering e Boughner (1991) utilizaram análise digital de imagens de cortes histológicos corados pelo picro-sirius associado à microscopia de luz polarizada para avaliar quantitativamente a idade e a extensão de lesões fibróticas em tecido muscular de ratos. Mediram o conteúdo de colágeno mediante cálculo da área ocupada pela imagem representativa de colágeno representada por tons de cinza (níveis variando de 1 a 255), enquanto as estruturas não colagenosas apresentavam-se escuras (nível de tom de cinza = 0). A medida de maturidade do colágeno foi realizada avaliando-se a intensidade do brilho apresentado pelas imagens calculando-se a média dos níveis de cinza do histograma gerado para cada imagem.

O método picro-sirius luz polarizada também foi utilizado para quantificar o conteúdo e a maturação do colágeno de miocárdio de cães associado à análise digital de imagem, o que fez melhorar a avaliação quantitativa de tecidos histológicos pela microscopia óptica (WHITTAKER et al., 1994).

A intensidade da birrefringência geralmente é determinada medindo-se o retardo da luz polarizada linear em estruturas distintas. Pickering e Boughner (1991) observaram que para uma grande gama de valores de retardo óptico do colágeno corado pelo picro-sírio, as mudanças na intensidade do brilho aproximam-se das alterações no retardo. Por isso o brilho do colágeno pode ser um indicador valioso da ordem fibrilar e molecular.

2.4.2 Análise de Orientação de fibras

A transformada de Fourier tem sido empregada na análise digital de imagens para a avaliação da orientação de fibras colágenas em ligamentos (CHAUDHURI et al., 1987), cartilagem (XIA; ELDER, 2001), fibrilas em géis de colágeno (KIM et al., 2006), em microestrutura de fibras têxteis (POURDEYHIMI et al., 1997) e em matrizes usadas em engenharia de tecidos (AYRES et al., 2006; AYRES et al., 2007; AYRES et al., 2008).

Estas técnicas exploram algumas das propriedades básicas da transformada de Fourier que é capaz de reduzir a complexa configuração de uma imagem digital em termos de seus componentes de frequência. Uma imagem digital é composta de pixels com intensidades que variam no espaço bidimensional da imagem. Mudanças rápidas na intensidade são indicativas de bordas no objeto e também de sua orientação e podem ser quantitativamente analisadas pela transformada de Fourier no domínio de frequências (SANDER; BAROCAS, 2009).

A transformada discreta bidimensional de Fourier em uma imagem digital de tamanho $M \times N$ é dada por (BURGER; BURGE, 2008):

$$F(u, v) = \frac{1}{\sqrt{MN}} \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} f(x, y) e^{-i2\pi\left(\frac{ux}{M} + \frac{vy}{N}\right)} \quad (1)$$

Onde x e y representam as coordenadas espaciais da imagem, u e v os componentes de frequência no domínio de Fourier, sendo $i = \sqrt{-1}$.

Similarmente a inversa da transformada discreta bidimensional de Fourier em uma imagem digital de tamanho $M \times N$ é dada por (BURGER; BURGE, 2008):

$$f(x, y) = \frac{1}{\sqrt{MN}} \sum_{u=0}^{M-1} \sum_{v=0}^{N-1} F(u, v) e^{i2\pi(\frac{ux}{M} + \frac{vy}{N})} \quad (2)$$

A transformada de $f(x,y)$ é frequentemente complexa, contendo uma parte real $R(u,v)$ e uma parte imaginária $I(u,v)$. Ela é tipicamente representada através de seu espectro de potência (SANDER; BAROCAS, 2009).

$$P(u, v) = |F(u, v)|^2 = R^2(u, v) + I^2(u, v) \quad (3)$$

O espectro de Fourier que é simétrico em relação à origem mostra as magnitudes relativas dos componentes de frequência da imagem. A frequência aumenta radialmente a partir da amplitude de frequência zero ao centro, a qual corresponde ao valor médio das intensidades de tons de cinza da imagem. As linhas horizontais na imagem de domínio espacial são representadas por picos no domínio de frequência ao longo do eixo vertical. Portanto, os objetos na imagem que estão orientados a um ângulo α geram picos a um ângulo $(\alpha + 90)^\circ$ no domínio de frequência (SANDER; BAROCAS, 2009).

2.4.3 Análise Fractal

A geometria fractal fornece métodos para caracterizar a complexidade e consequentemente, dentro do contexto da análise de imagens, ela pode ser usada para quantificar morfologias que são consideradas aleatórias, irregulares ou que somente podem ser avaliadas qualitativamente (LANDINI, 1996).

A dimensão Euclideana regular atribui um número inteiro a cada ponto ou conjunto de pontos no espaço Euclidiano e inclui os descritores geométricos: 0 para um ponto, 1 para uma linha reta, 2 para uma superfície plana, e 3 para um volume. Estes descritores inteiros são expoentes de funções de potência que descrevem estes objetos. Devido a sua complexidade, estruturas macro ou micro anatômicas não podem ser descritas ou não correspondem às figuras geométricas Euclidianas (FUSELER et al., 2007).

Um método quantitativo que se tornou útil para caracterizar estruturas irregulares complexas é a análise fractal. A análise fractal permite quantificar a irregularidade e a complexidade de objetos por um valor conhecido como dimensão fractal. A dimensão fractal difere da dimensão topológica pelo fato de que ela pode ter um valor não inteiro, e quanto mais irregular e complexo for o objeto, maior será sua dimensão fractal relativa à sua dimensão topológica (TAMBASCO et al., 2009).

A dimensão fractal é uma medida que caracteriza o preenchimento espacial de um objeto e está relacionada à sua complexidade estrutural (DOUGHERTY, 2009). Indica a variação no nível de detalhes de uma estrutura à medida que a estrutura é observada por escalas distintas (PEITGEN et al., 2004). Existem vários tipos de análise de dimensão fractal com aplicações e métodos próprios para seu cálculo (CROSS, 1994). A maioria delas mede as estruturas de um objeto a uma escala ε de maneira a ignorar as variações menores que ε , observando o comportamento destas medidas quando ε tender a zero (FALCONER, 2003).

Um método que se baseia neste conceito e é amplamente usado para estimar a dimensão fractal de imagens microscópicas é o método de Box-counting (CROSS, 1994; TAMBASCO et al., 2009). A dimensão fractal de Box-counting pode ser usada

para analisar o espalhamento ou a irregularidade de um conjunto (FALCONER, 2003).

O método de Box-counting consiste em sobrepor uma malha quadriculada formada de quadrados de tamanho \mathcal{E} sobre a imagem a ser avaliada, e contar o número de quadrados que contêm qualquer parte da figura computando um valor de $N(\mathcal{E})$. Este procedimento é repetido para diferentes tamanhos de \mathcal{E} , e a dimensão $D(\mathcal{E})$ é expressa por

$$D(\mathcal{E}) = \frac{\log(N(\mathcal{E}))}{-\log(\mathcal{E})} \quad (4)$$

A dimensão fractal de Box-counting (D_B) é então calculada do valor negativo da inclinação da reta de regressão linear de $\log(N(\mathcal{E}))$ e $\log(\mathcal{E})$ (LANDINI, 1996).

A estimação da dimensão fractal quando aplicada a imagem de estruturas encontradas na natureza deve ser calculada entre valores de \mathcal{E} pertencentes a uma faixa onde a inclinação do gráfico construído para o cálculo da dimensão fractal seja linear. Esta faixa linear corresponde aos limites físicos das estruturas avaliadas na imagem, e além destes limites o gráfico começa a desviar da linearidade. Este desvio ocorre porque o tamanho dos quadrados usados no método Box-counting não contêm nova informação estrutural como quando o tamanho dos quadrados se aproxima da resolução da imagem ou quando se tornam maiores que a maior estrutura presente na imagem (TAMBASCO et al., 2009).

3 HIPÓTESE

O arranjo das fibras transeptais é diferente na região central do espaço interproximal quando comparado com as regiões de suas extremidades mesial e distal próximas às inserções nos dentes adjacentes.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e quantificar o arranjo de fibras transeptais usando microscopia óptica de luz polarizada, histoquímica e histomorfometria.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em cortes histológicos sagitais na região entre primeiro e segundo molares da maxila de ratos Wistar machos saudáveis, nas regiões mesial, central e distal da gengiva interproximal nas áreas ocupadas pelas fibras transeptais, avaliar, quantificar e comparar os seguintes parâmetros de organização das fibras transeptais:

- a) Intensidade de Brilho.
- b) A orientação.
- c) A densidade de ocupação.
- d) A dimensão fractal.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, certificado pelo Protocolo nº 011/2006 – CEEA.

A utilização e manejo dos animais foram conduzidos de acordo com as regras do “International Council for Laboratory Animal Science” (DEMERS et al., 2006).

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados 12 ratos Wistar machos com oito meses de idade, pesando 373 ± 10 g (média \pm d.p.), fornecidos pelo Biotério do Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora.

Os animais foram alojados após o desmame, em grupos de três, em gaiolas de polipropileno com cama de maravalha, mantidos em armários climatizados situados em ambiente com ciclo de iluminação claro/escuro de 12 horas cada e temperatura controlada (23 ± 2 °C). Alimentaram-se de ração peletizada e água filtrada *ad libitum* dispostos em compartimentos próprios da gaiola, cocho e mamadeira respectivamente.

5.2 COLETA DAS AMOSTRAS

As maxilas dos animais foram removidas cirurgicamente logo após sua eutanásia por dose excessiva de anestésico por meio de injeção intraperitoneal de Xilazina (10 mg/kg) e Ketamina (180 mg/kg). Antes da retirada cirúrgica da maxila, a região intrabucal dos animais (Figura 2) foi avaliada clinicamente verificando-se a presença e a condição clínica de todos os dentes, atentando-se para possíveis

sinais de inflamação gengival, impacção de restos de alimento ou maravalha na região interdental, ou de diastema entre os primeiros e segundos molares maxilares, fatores estes que excluiriam o animal do estudo.

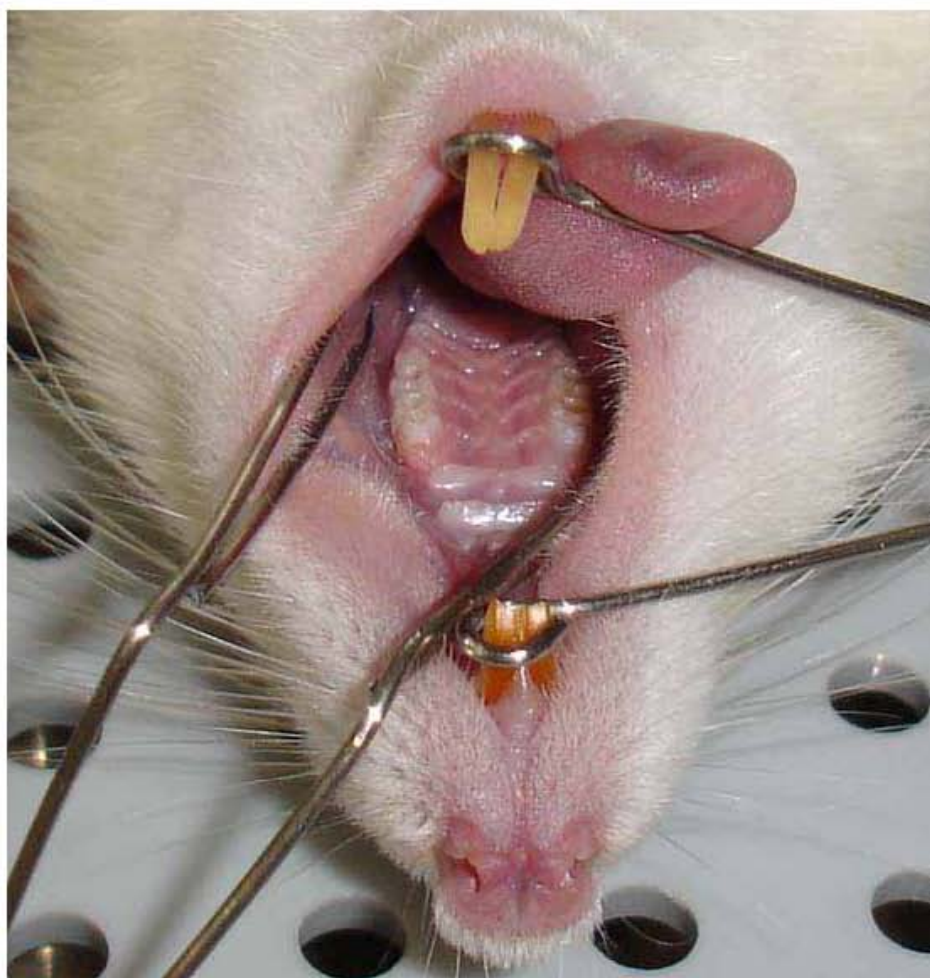


Figura 2 - Aspecto clínico intrabucal da maxila de rato Wistar.

5.3 PREPARO HISTOTÉCNICO, HISTOLÓGICO E HISTOQUÍMICO.

As amostras removidas foram fixadas em formol tamponado a 10% por 48 horas. Após a fixação as peças foram submetidas a processo de descalcificação com solução aquosa de ácido nítrico a 5% com o intuito de remover todo o cálcio do tecido ósseo e dentes permitindo o processamento histológico do material.

A detecção do ponto final de descalcificação foi realizada pelo método radiográfico (SKINNER, 2003). Foi utilizado um posicionador, previamente confeccionado (DE OLIVEIRA et al., 2008), para a padronização das tomadas radiográficas mantendo a orientação e a distância foco-filme constante entre as aquisições das imagens. O ponto final de descalcificação foi determinado quando os tecidos calcificados não eram mais observados nas imagens (Figura 3).

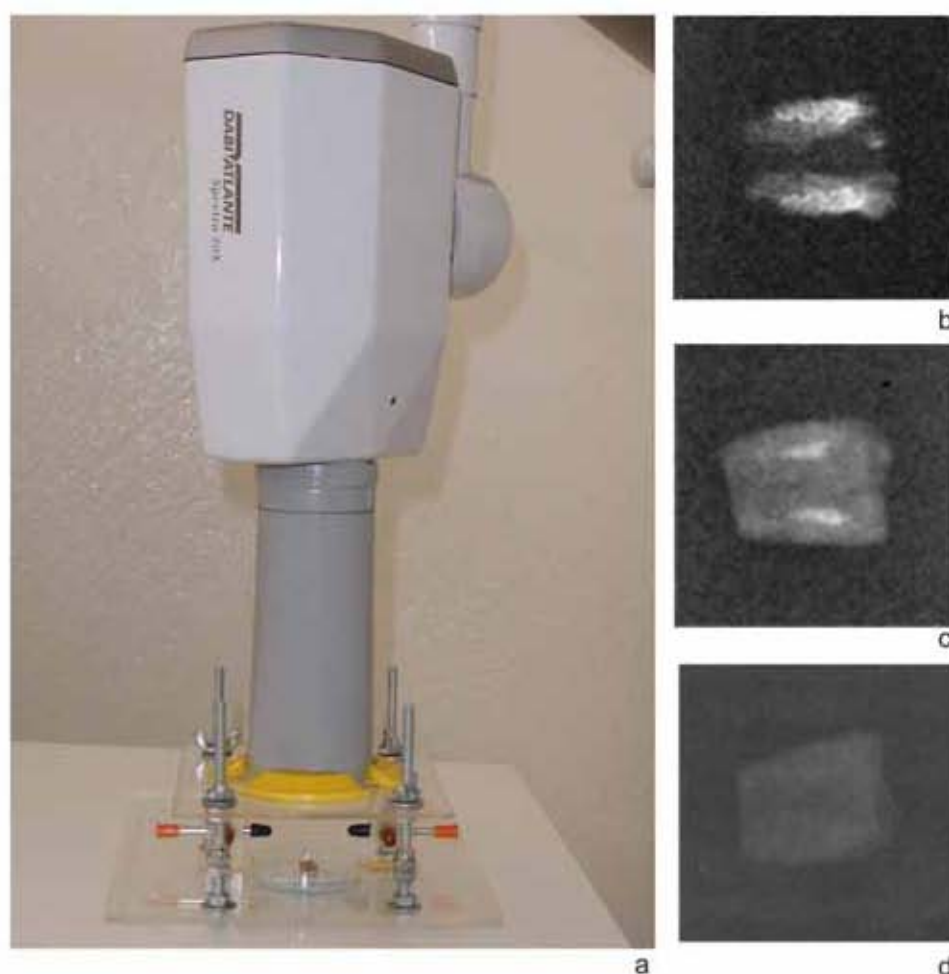


Figura 3 - Avaliação radiográfica do ponto final de descalcificação de maxila de rato. (a) Tomada radiográfica da maxila de rato utilizando o posicionador acoplado à fonte de raios-x (b) Imagem radiográfica adquirida antes do início da descalcificação. (c) Imagem radiográfica intermediária. (d) Imagem radiográfica do ponto final de descalcificação da maxila.

As maxilas descalcificadas foram seccionadas na linha média e as hemimaxilas direitas foram lavadas em água corrente, desidratadas em concentrações

gradativas de álcool, clareadas em xileno e incluídas em parafina. Com micrótomo rotatório (Micron HM 340E, Waldorf, Germany), foram realizados seis cortes seriados com cinco micrômetros de espessura da região interdental abrangendo os primeiros e segundos molares seguindo orientação sagital. Em seguida os cortes foram montados em lâminas de vidro sendo o primeiro corado pela Hematoxilina-eosina e os outros cinco corados pelo método de picro-sirius (JUNQUEIRA et al., 1979), utilizando o corante Sirius red a 0,1% (Directed Red 80, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em solução aquosa saturada de ácido pícrico.

5.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os cortes corados com Hematoxilina e Eosina (Figura 4) foram submetidos à avaliação histopatológica pela microscopia óptica de campo claro com o objetivo de verificar a condição de saúde tecidual gengival identificando possíveis alterações patológicas como a presença de infiltrado inflamatório e processos de degradação das fibras transeptais que excluiriam o material daquele animal da amostra.

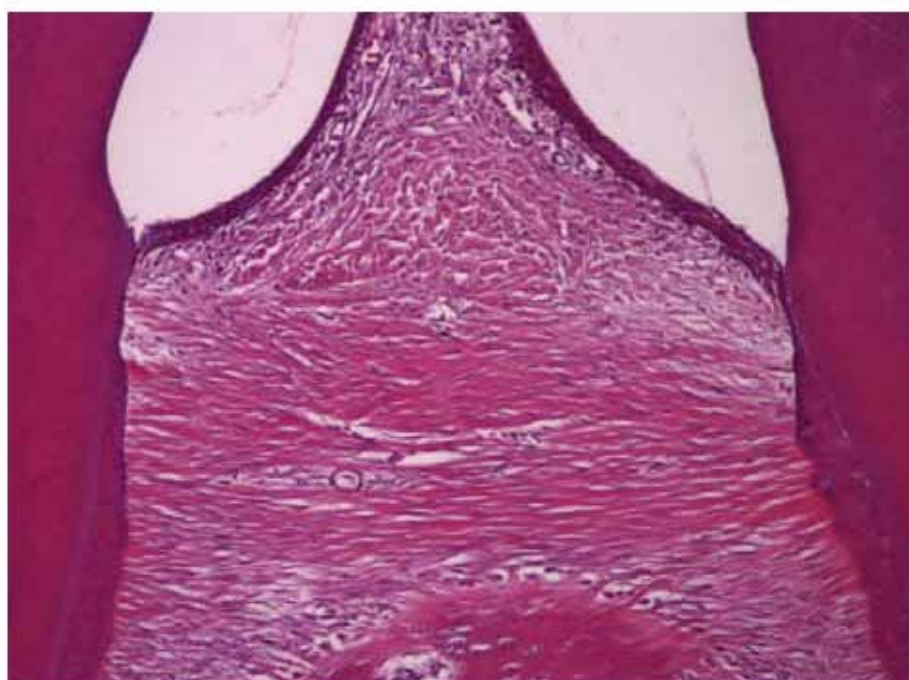


Figura 4 - Corte histológico sagital da região transeptal entre o primeiro e segundo molares maxilares de rato Wistar corado com Hematoxilina e Eosina, microscopia de campo claro, 10X.

5.5 ANÁLISE HISTOQUÍMICA E HISTOMORFOMÉTRICA

Os cortes corados pelo picro-sirius foram inicialmente observados por microscopia de campo claro com objetiva de 10X. Neste aumento era possível visualizar toda a área da gengiva interproximal assim como o primeiro e segundo molar. Os cortes que apresentaram artefatos de técnica, ou que as fibras transeptais mostravam-se com interrupções devido à presença de vasos, eram excluídos e novo corte era obtido e corado para avaliação. A avaliação com microscopia de luz polarizada e a captura das imagens somente foram realizadas nos cortes que demonstraram uma continuidade das fibras transeptais desde o cimento do primeiro molar até o cimento do segundo molar maxilar.

5.5.1 Microscopia de luz polarizada e captura digital de imagens

Para análise histoquímica e histomorfométrica dos cortes das fibras gengivais transeptais corados pelo picro-sírius, utilizou-se microscopia de luz polarizada com um microscópio (AxioPhot I, Carl Zeiss, Jena, Germany) equipado com dois filtros polarizadores lineares (polarizador e analisador), objetivas 10X e 40X, lâmpada halógena, platina rotatória e câmera digital (AxioCam ICc3, Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

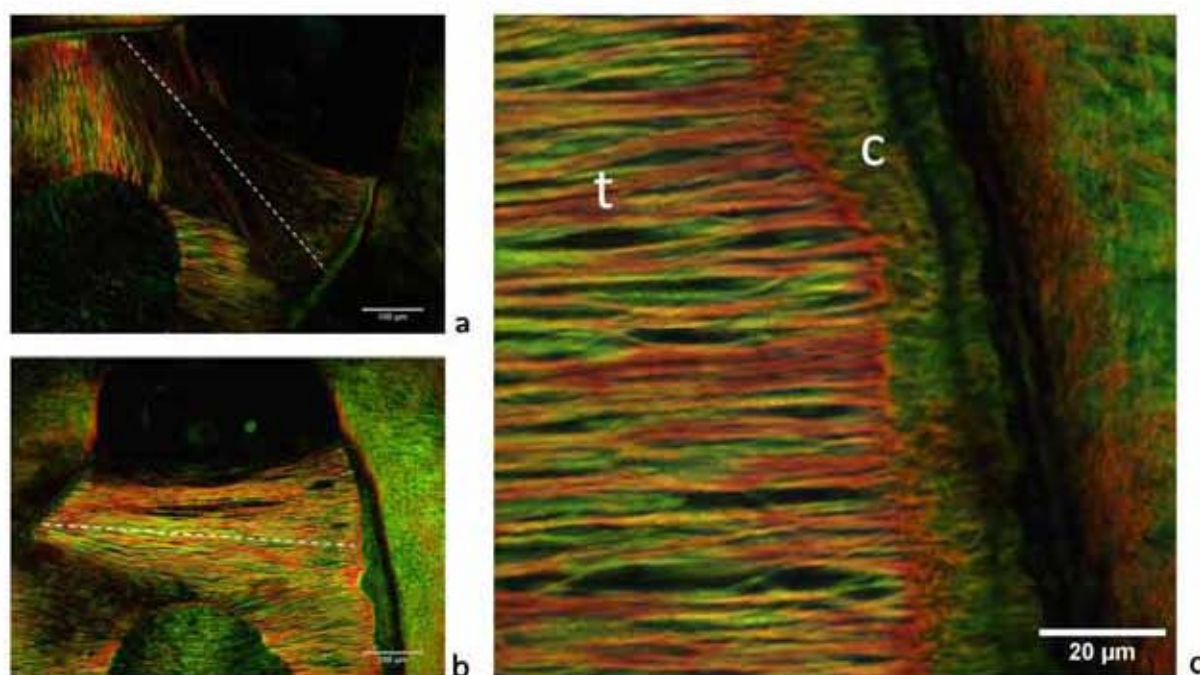


Figura 5 - Corte histológico sagital da região gengival interdental entre o primeiro e segundo molares maxilares de rato Wistar corado pelo picro-sírius e observado por microscopia de luz polarizada. (a) Posição de extinção da imagem das fibras transeptais, a linha tracejada representa a direção do trajeto das fibras. (b) Posição de brilho máximo das fibras. (c) Porção distal das fibras transeptais (t) e sua inserção no cimento (C).

Inicialmente o microscópio foi ajustado para o modo de iluminação de Köehler. Em seguida, efetuou-se o ajuste dos filtros polarizadores onde o filtro analisador permanecia numa posição fixa e o filtro polarizador era girado até que o fundo mais escuro fosse observado. Nesta posição os filtros estavam cruzados e as lâminas eram avaliadas. Toda a extensão da região gengival ocupada pelas fibras transeptais era primeiramente observada usando-se a objetiva 10X. Nesta configuração a platina era girada observando-se a posição de extinção da imagem das fibras transeptais (Figura 5a) até uma posição de brilho máximo das fibras (Figura 5b), observado visualmente e certificado pela medição do menor tempo de exposição apresentado pelo painel do software de captura com a opção “Auto Live” selecionada. Com a platina nesta posição, utilizando a objetiva de 40X (Figura 5c) e com o tempo de exposição pré-ajustado e igual para todas as aquisições, eram capturadas três regiões de 512 x 512 pixels (46.08 μm x 46.08 μm) cada ao longo da gengiva interdental nas seguintes posições (Figura 6): (1) porção mesial das fibras transeptais próxima ao cimento do primeiro molar (Região Mesial); (2) porção das fibras situada na região central do espaço interproximal acima da crista óssea alveolar (Região Central) e (3) porção distal das fibras próxima ao cimento do segundo molar (Região Distal).

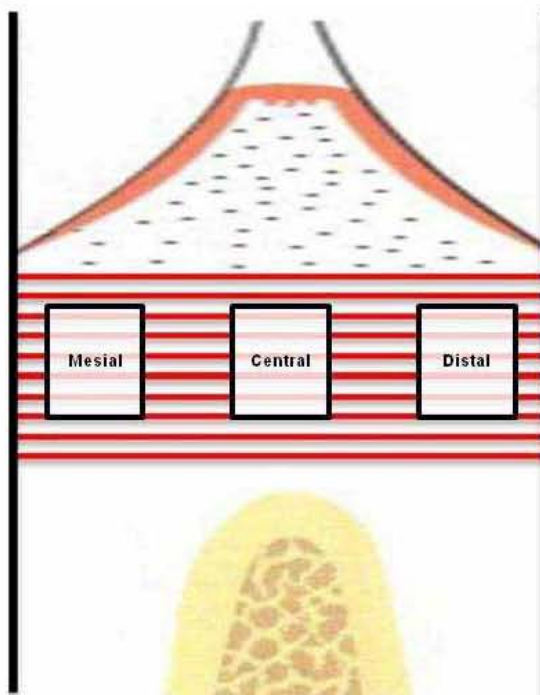


Figura 6 - Regiões de captura de imagem e avaliação.

5.5.2 Processamento e análise das imagens

As imagens foram capturadas pelo software AxioVision (AxioVs40 v4.7.2.0, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) em RGB (24 bit: 8 bits/canal) com as mesmas condições de tempo de exposição e foram gravadas em arquivos no formato TIFF sem compressão. Entretanto, somente foram usados para o processamento das imagens os canais de cor vermelha e verde. O canal azul foi desprezado porque produziu somente imagens de fundo e ruídos com intensidade de sinal muito baixa. Isto se deve ao fato das cores de interferência das fibras colágenas coradas pelo micro-sirius estarem na faixa de comprimento de onda entre o verde e o vermelho (MONTES; JUNQUEIRA, 1982).

Os parâmetros histomorfométricos foram medidos usando-se processamento e análise digital de imagens. Todo o processamento digital das imagens capturadas foi realizado pelo programa ImageJ (versão 1.43b; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) com recursos adicionais instalados e programados como descrito a seguir:

- a) Para o cálculo da transformada de Fourier e de sua inversa foram instalados os Plugin FFTDirect e FFTInverse respectivamente (Dougherty, 2009).
- b) Para a medição radial do espectro de Fourier foi instalado o Plugin “Oval Profile Plot” (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/oval-profile.html>).
- c) Para a produção da janela de Hanning foi efetuada correção na definição matemática da janela de Hanning com o reconhecimento e publicação por Burger e Burge, (2008, p. 355) e Burger e Burge (2006, p. 343) e subsequentemente realizada a programação de rotina específica baseada nesta reformulação.

Esta rotina encontra-se publicada em “HanningWindow” (<http://rsb.info.nih.gov/ij/macros/HanningWindow.txt>).

- d) Para a geração do Filtro Direcional baseado no método de Chaudhuri et al.,(1987), foi efetuada programação de rotina específica publicada em: “DirectionalFilterWindow”<http://rsb.info.nih.gov/ij/macros/DirectionalFilterWindow.txt>)

5.5.3 Medida da orientação das fibras

A orientação preferencial das fibras transeptais foi medida utilizando-se o método de Ayres *et al.* (2008), pela medição radial do espectro de Fourier obtido pelo cálculo da transformada rápida de Fourier das imagens capturadas das fibras.

Inicialmente as imagens capturadas foram convertidas em tons de cinza e foi gerada uma janela de Hanning (Figura 7) de tamanho 512 X 512 pixels. Cada imagem das fibras foi multiplicada pela janela de Hanning antes do cálculo da transformada de Fourier para reduzir a supressão de frequências no espectro provenientes das bordas das imagens (CHAUDHURI *et al.*, 1987; BURGER; BURGE, 2008).

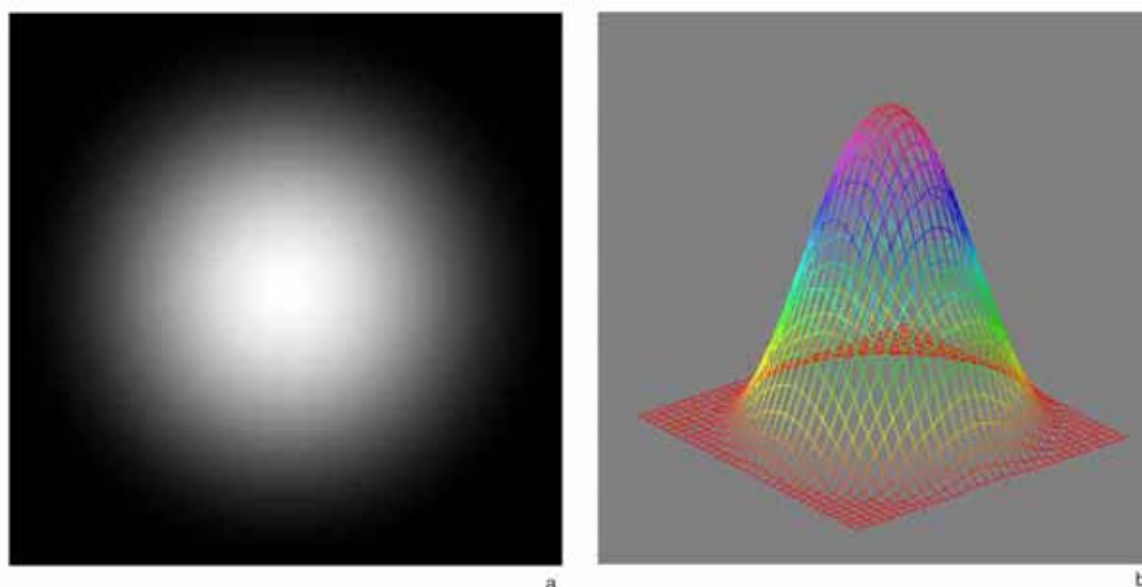


Figura 7 - (a) Imagem da janela de Hanning gerada pela macro "HanningWindow"; (b) Gráfico de superfície das intensidades geradas pela função janela de Hanning em (a).

A transformada Rápida de Fourier (FFT) das imagens com a geração do respectivo Espectro de Fourier foi obtida. Em seguida foi produzido um gráfico com a medição radial das intensidades do Espectro de Fourier.

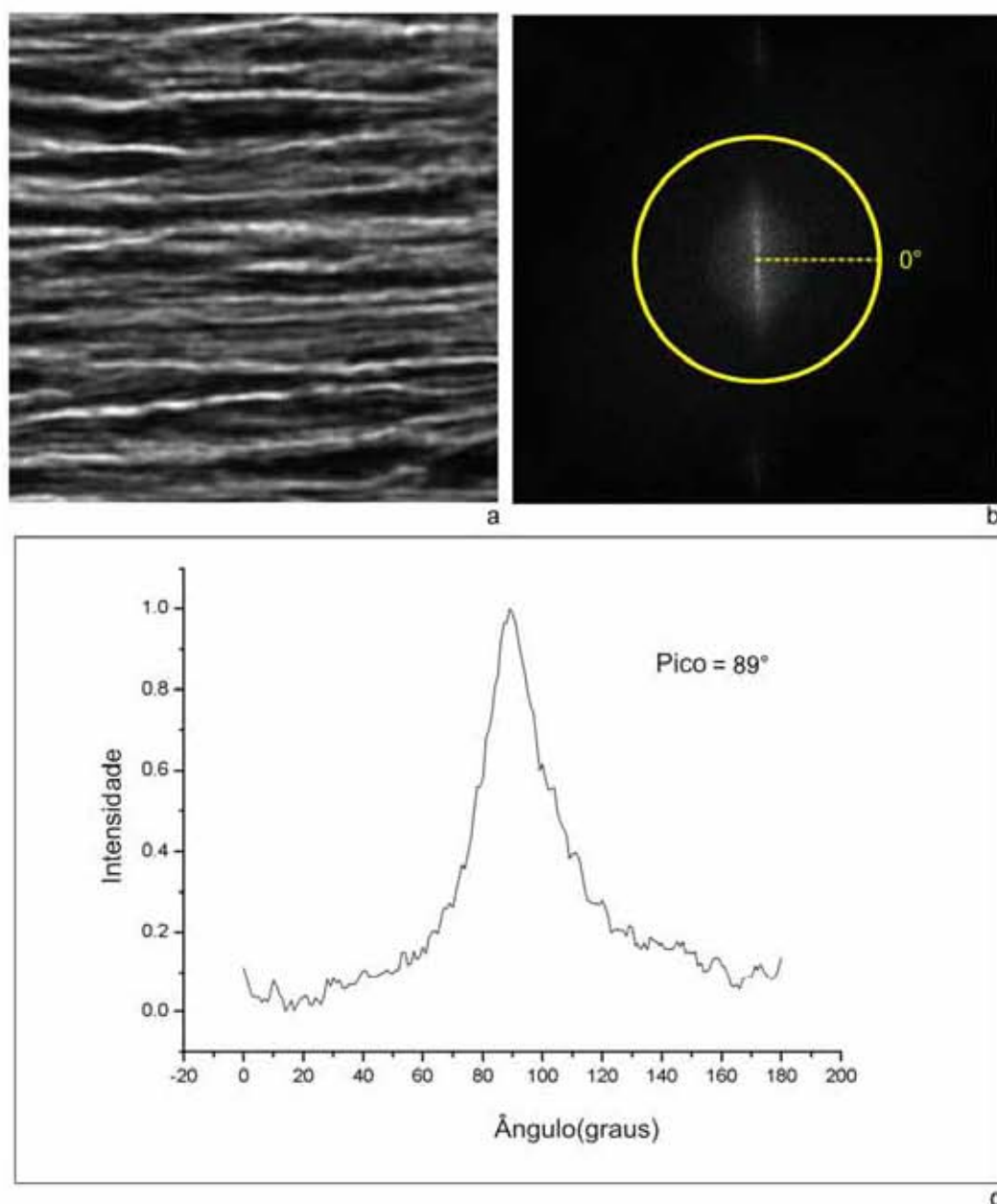


Figura 8 - Método da transformada de Fourier usado para medir a orientação preferencial das fibras. (a) Imagem em tons de cinza de uma região das fibras transeptais capturada com objetiva de 40X. (b) Espectro de Fourier da imagem da Figura 4a. A circunferência mostra a região da medida das intensidades ao longo de seu raio entre 0° e 180° no sentido horário.(c) A posição do pico de intensidade máxima representa o eixo principal de orientação das fibras somado de 90° .

Para obter este gráfico, era centralizado sobre a imagem do Espectro de Fourier, um círculo de raio igual a 128 pixels, suficiente para abranger as

frequências de interesse, e as intensidades ao longo de cada raio eram somadas pelo Plugin (“Oval Profile Plot”) entre 0° to 180° com incrementos de 1° (AYRES et al., 2007).

As intensidades medidas foram normalizadas a um valor base de zero e a posição do pico de máxima intensidade sobre o gráfico foi registrada. A posição do pico de intensidade máxima representa o eixo principal de orientação das fibras somado de 90° (Figura 8).

5.5.4 Densidade de ocupação das Fibras

Para seleccionar as imagens pertencentes às fibras foi realizada segmentação após filtragem direcional. O processo está representado na Figura 9.

Foi utilizado o método de Chaudhuri *et al.* (1987) para realizar a filtragem direcional das fibras por transformada de Fourier. Como os feixes de fibras transeptais apresentam uma direcção bem definida, este método foi utilizado para separar as frequências onde as maiores intensidades estão concentradas (imagem dos feixes de fibras) dos componentes com intensidade baixa (imagens de fundo, elementos desfocados provenientes de fibras de tamanho inferior que a resolução óptica do microscópio ou imagens de fibras fora do plano focal).

Utilizando-se a macro “DirectionalFilterWindow” foram geradas janelas de filtragem direcional com o ângulo central coincidente com o eixo principal de orientação das fibras de cada imagem, previamente calculado, e largura de banda de 90°. Desta forma os componentes das imagens das fibras com direcção pertencente ao intervalo angular compreendido pelo ângulo central do filtro ($\pm 45^\circ$) eram preservados, eliminando-se os componentes de imagem externos a este

intervalo. Desta forma somente as imagens dos feixes principais de fibras eram destacadas.

Para a aplicação do filtro os canais de cor vermelho e verde de cada imagem eram separados e suas imagens em tons de cinza eram obtidas.

Na imagem de cada canal era calculada a transformada de Fourier e seus Espectros de Fourier eram multiplicados pelo filtro direcional de tamanho 512 X 512 Pixels previamente obtido para cada imagem. As imagens filtradas foram obtidas calculando-se a transformada inversa de Fourier do Espectro Filtrado.

Para determinar a área ocupada pelas fibras nas imagens resultantes, as imagens eram submetidas ao comando "Threshold" pelo método de Otsu (1979), transformadas em preto e branco (comando "Make Binary") e as imagens dos canais vermelho e verde eram combinadas por adição formando uma máscara representando a área ocupada pelas fibras.

Após o processo de segmentação, o conteúdo de fibras foi calculado utilizando o comando "Measure" com a opção "Area Fraction" que calcula a proporção percentual da área da máscara binária de fibras em relação à área total da imagem (WHITTAKER et al., 1994). Esta medida quantitativa forneceu a densidade de ocupação das fibras em cada imagem avaliada.

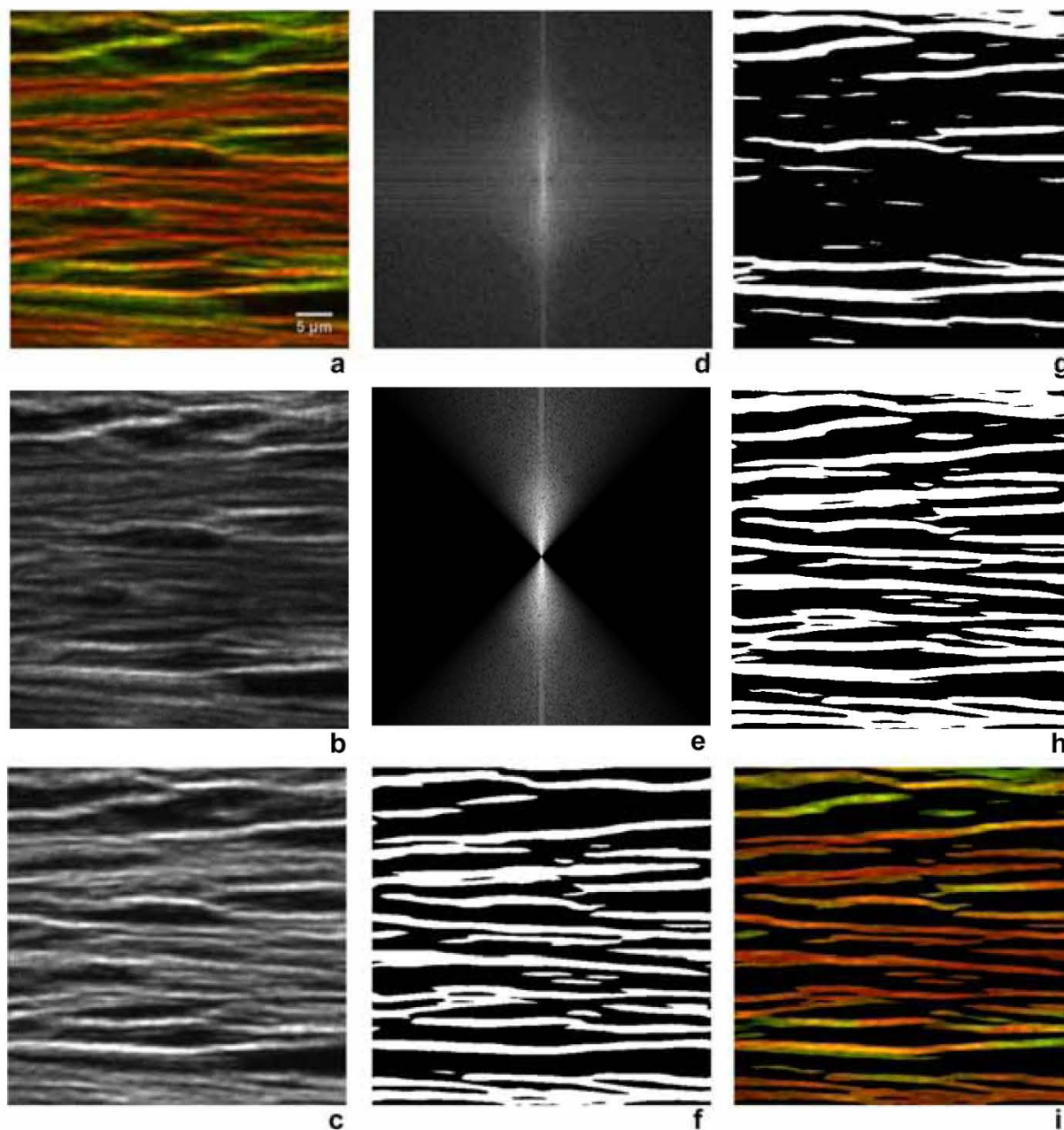


Figura 9 - Processo de filtragem e segmentação. (a) Imagem das fibras transeptais capturada com objetiva 40X. (b) Imagem em tons de cinza do canal verde. (c) Imagem em tons de cinza do canal vermelho. (d) Espectro de Fourier da imagem da Figura 5c. (e) O resultado da multiplicação do espectro de Fourier pelo filtro direcional. (f) Imagem binária resultante do canal vermelho. (g) Imagem binária resultante do canal verde. (h) Máscara resultante da adição das imagens binárias dos canais vermelho e verde. (i) As fibras principais segmentadas após a aplicação da máscara sobre a imagem inicial da Figura 5a.

5.5.5 Dimensão Fractal

A análise fractal foi realizada mediante cálculo da dimensão fractal pelo método de Box-counting, utilizando o programa Benoit 1.3 (TruSoft International Inc., Florida, USA).

Este programa calcula a dimensão fractal de imagens gravadas no formato BMP. Desta forma, todas as imagens das máscaras binárias provenientes do cálculo da densidade de ocupação das fibras foram convertidas para este formato antes do processamento pelo programa.

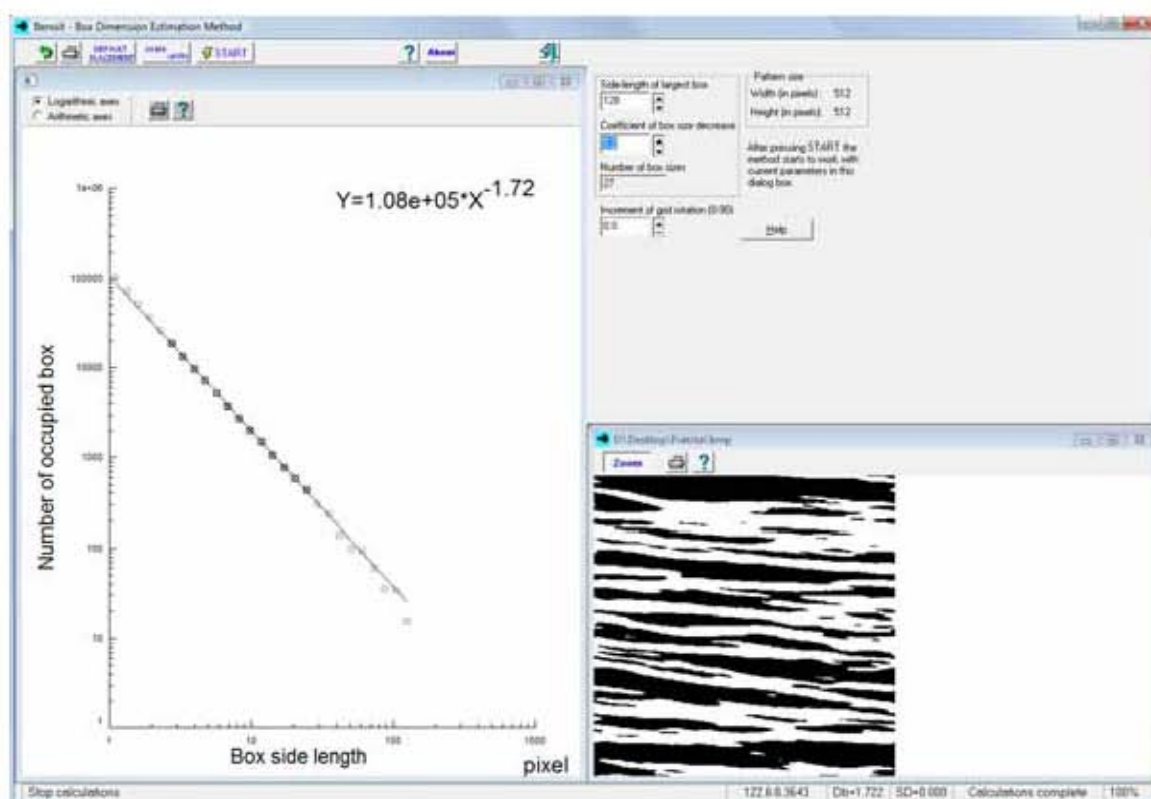


Figura 10 - Tela do programa Benoit 1.3. Observa-se a imagem da máscara binária das fibras e o gráfico de regressão linear e o valor da inclinação da reta de regressão após a seleção dos limites para cálculo representando o valor negativo da dimensão fractal.

O programa calcula automaticamente dimensão fractal da imagem variando o tamanho dos quadrados gerando um gráfico com os pontos utilizados para o cálculo da regressão linear. Entretanto ele permite, após o cálculo automático, que o usuário marque os pontos sobre o qual a regressão linear é calculada re-calculando assim a dimensão fractal apenas dentro dos limites seleccionados (Figura10).

Desta forma para o cálculo da dimensão fractal das fibras transeptais, em cada imagem avaliada, foram marcados os pontos correspondentes à faixa em que o gráfico se encontrava linear.

5.5.6 **Medida da intensidade máxima de brilho das fibras:**

A intensidade de brilho do colágeno observado pela luz polarizada não depende somente da propriedade de birrefringência do colágeno, mas é também influenciado pela orientação da fibra em relação aos filtros polarizadores (PICKERING; BOUGHNER, 1991).

Desta maneira, mediu-se a intensidade do brilho das fibras transeptais nas imagens capturadas como forma de comparação da orientação das mesmas em relação às áreas avaliadas.

O histograma de intensidades de tons de cinza foi medido em cada imagem capturada utilizando a máscara binária de segmentação para limitar a região da medição do histograma pelo programa. Desta maneira, somente o brilho apresentado pelos feixes de fibras segmentados foram medidos. O histograma de intensidade foi calculado em cada imagem utilizando a média dos níveis de intensidade de cinza dos canais de cor vermelho e verde.

Os parâmetros de brilho foram obtidos calculando-se a média e o desvio padrão de tons de cinza de cada histograma (WU et al., 2008).

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram apresentados como média e desvio padrão e foram examinados previamente pelo teste Kolmogorov-Smirnov para verificar distribuição normal encontrando-se $p > 0,05$. Portanto, os parâmetros quantitativos obtidos nas três regiões avaliadas foram comparados pela análise de variância (ANOVA). Quando ocorreu diferença nas médias foram aplicados testes *post hoc* de comparação múltipla, escolhidos de acordo com a homogeneidade das variâncias verificada pelo teste de Levene. Foram utilizados os testes de Bonferroni e Tamhane T2 para variâncias iguais e desiguais respectivamente. A relação entre as variáveis histomorfométricas foi verificada através de gráficos de dispersão. O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado para aqueles gráficos que demonstraram relação linear. O nível de significância dos testes foi de $\alpha = 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 ARTIGO PUBLICADOS

6.1.1 **Artigo I - A reliable positioning device for dorsoventral cephalometric radiography of the rat**

DE OLIVEIRA, R. S.; DE OLIVEIRA GUERRA, M.; PETERS, V. M.; VITRAL, R. W. A reliable positioning device for dorsoventral cephalometric radiography of the rat. **Lab Anim (NY)**, New York, v.37, n.3, p.127-31, 2008.

RESOURCES

Lab Animal - **37**, 3 (2008)
doi:10.1038/labani0308-127

A reliable positioning device for dorsoventral cephalometric radiography of the rat

Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira, MSc^{1, 2}, Martha de Oliveira Guerra, MSc, PhD³, Vera Maria Peters, MSc, PhD³ & Robert Willer Farinazzo Vitral, MSc, PhD²

¹ Health Graduate Program at the School of Medicine, Juiz de Fora Federal University, Minas Gerais, Brazil.

² Orthodontics Department, Juiz de Fora Federal University, Minas Gerais, Brazil.

³ Center of Reproductive Biology, Juiz de Fora Federal University, Minas Gerais, Brazil.

Correspondence should be addressed to Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira, MSc

In dental research, dorsoventral cephalometric radiography is often used to assess skull growth and dental movement in rat models. To ensure that images can be reproduced, radiographers must use a cephalostat to maintain the rat's head in a consistent position across imaging sessions. The authors describe a positioning device they designed that connects easily to a standard dental X-ray machine. The device enabled researchers to position rats repeatedly for radiographic imaging with very little variation.

6.1.2 Artigo II - Determinação do ponto de descalcificação para o preparo histológico de tecidos mineralizados

DE OLIVEIRA, R. S.; PETERS, V. M.; VITRAL, R. W. Determinação do ponto de descalcificação para o preparo histológico de tecidos mineralizados. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais – Animais e Humanos**. v.1, n.2, 2009. – no prelo.

Determinação do ponto de descalcificação para o preparo histológico de tecidos mineralizados.

Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira^a, Vera Maria Peters^b, Robert Willer Farinazzo Vitral^b

a - Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Saúde da UFJF, Bolsista FAPEMIG;

b - Professor Doutor da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

O exame histológico ou histopatológico de tecidos mineralizados como dente ou osso requer o emprego de agentes descalcificadores como ácidos fracos (fórmico, picrico ou acético), ácidos fortes (nitríco ou hidrocloreídrico) ou quelantes como o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Estes agentes têm a finalidade de promover a desmineralização ou descalcificação dos tecidos permitindo seu corte no micrótomo. A escolha do agente descalcificador está relacionada à urgência do exame ou à necessidade da técnica. Ácidos fortes, mesmo em concentrações baixas, promovem uma rápida descalcificação enquanto que com os ácidos fracos e os quelantes este processo é mais lento podendo chegar a vários meses. A descalcificação rápida pode introduzir artefatos como distorção do tecido devido à sua contração ou mesmo dificultar o processo de coloração. Para minimizar os efeitos adversos da descalcificação rápida é importante evitar a exposição prolongada ao ácido interrompendo o processo quando todo o cálcio for removido do tecido. Vários métodos de determinação do ponto final de descalcificação podem ser utilizados para o controle do procedimento de descalcificação. O Quadro 1 relaciona estes métodos apresentando suas vantagens e desvantagens. A escolha do melhor método depende da disponibilidade de recursos técnicos e de material.

6.2 CÓDIGOS DE SOFTWARE PUBLICADOS

6.2.1 Código I - Hanning Window

DE OLIVEIRA, R. S.; PETERS, V. M.; VITRAL, R. W. ImageJ Macro
"Hanning Window", U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA,
2009. <http://rsb.info.nih.gov/ij/macros/HanningWindow.txt>

```
/* ImageJ Macro "Hanning Window"

Authors: Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira, Vera Maria Peters, Robert
Willer Farinazzo Vitral
Address: Universidade Federal de Juiz de Fora - Brazil
Email: R.Sotto-Maior (roberto at aparelho dot com)

This Macro generates a Hanning Window Function Image to be used in
Discrete Fourier Transform computing applications.
The windowing function image size should be informed in the dialog
Window.
This code produces a 32 bit image Hanning Window with equal height and
width dimensions.

References:

Burger, W., Burge, M., 2008. Digital image processing: an algorithmic
introduction using Java, 1st ed. Springer, New York. p.352-358.
R.Sotto-Maior. Errata. Table 14.3: error in equation for Hanning windowing
function. http://www.imagingbook.com/fileadmin/en/errata1/ch14-355.pdf.

Acknowledgement: The support from FAPEMIG (Fundacao de Amparo a Pesquisa
de Minas Gerais) is gratefully acknowledged.
```

6.2.2 Código II - Directional Filter Window

DE OLIVEIRA, R. S.; PETERS, V. M.; VITRAL, R. W. ImageJ Macro "Directional Filter Window", U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 2009. <http://rsb.info.nih.gov/ij/macros/DirectionalFilterWindow.txt>

```
/* ImageJ Macro "Directional Filter Window"

Authors: Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira, Vera Maria Peters, Robert
Willer Farinazzo Vitral
Address: Universidade Federal de Juiz de Fora - Brazil
Email: R.Sotto-Maior (roberto at aparelho dot com)

This Macro generates a filter window image to be used in Fourier Domain
Directional Filtering applications.
The filter image size, the angles band theta1 and theta2, and the alfa
coefficient should be informed in the dialog Window.
The angle parameters should be entered in degrees.
This code produces a 32 bit image Directional Filter Window with equal
height and width dimensions.

Reference:

Chaudhuri S, et al. A Fourier domain directional filtering method for
analysis of collagen alignment in ligaments. IEEE Trans. Biomed. Eng. 1987
Jul; 34(7): 509-18.
```

6.3 REFORMULAÇÃO DE EQUAÇÃO MATEMÁTICA PUBLICADA EM LIVRO

6.3.1 Livro I - Fehler in Definition des Hanning-Fensters

Identificação de erro na definição da equação matemática da janela de Hanning do livro Burger, W. und M. Burge. Digitale Bildverarbeitung: Eine Einführung mit Java und ImageJ. Berlin: Springer-Verlag. 2006. p.343. Os autores do livro publicaram a correção em forma de errata como reconhecimento de meu relato: R.Sotto-Maior. “Fehler in Definition des Hanning-Fensters”. <http://www.imagingbook.com/index.php?id=57>. Acessado em 25/07/2009.

6.3.2 Livro II - Error in equation for Hanning windowing function

Identificação de erro na definição da equação matemática da janela de Hanning do livro Burger, W. and M. Burge. Digital image processing: an algorithmic introduction using Java. New York: Springer. 2008. p. 355. A correção foi publicada pelos autores do livro em forma de errata como reconhecimento do relato: R.Sotto-Maior. "Error in equation for Hanning windowing function". In: <http://www.imagingbook.com/index.php?id=103>. Acessado em 25/07/2009.

6.4 ARTIGO PREPARADO PARA A PUBLICAÇÃO

6.4.1 Artigo - Histomorphometric analysis of the arrangement of transseptal fibers in rat gingiva

DE OLIVEIRA, R. S.; DE OLIVEIRA GUERRA, M.; PETERS, V. M.; VITRAL, R. W. Histomorphometric analysis of the arrangement of transseptal fibers in rat gingiva.

Abstract

The transeptal fibers are located in the lamina propria of the gingiva between adjacent teeth. They are often described as a group of collagen fibers embedded in the cementum of one tooth that follows a straight path over the alveolar bone crest and embeds itself in the cementum of the adjacent tooth. In a distinct way, it was reported that the transeptal fibers are not continuous over its full length but originates from the adjacent teeth interlacing in the central area of the interproximal gingiva. The present study aimed to evaluate and quantitate the gingival transseptal fibers arrangement by histomorphometry and histochemistry of sagittally cut tissue sections of the interdental region between first and second maxilar molar teeth of 12 male Wistar rat. The collagen fibers were stained with Picrosirius red staining and assessed with linear polarized light microscopy, digital image processing and analysis based on Fourier transform measurements and filtering techniques. In three different areas of the interdental gingiva, we measured histomorphometrical parameters like fiber orientation, area fraction and fractal dimension. The maximal brilliance presented by the fibers was evaluated using intensity histogram measurements. These quantitative parameters were compared among three different regions of interest along the length of the interdental gingiva using one-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's or Tamhane's T2 post hoc tests. There was an increase ($p < 0.05$) in area fraction and fractal dimension parameters in the central region compared to regions near the teeth, and no difference in the orientation and maximal brilliance of fibers among the tree regions. Our results quantitative demonstrated a denser arrangement of the fibers in the central region reinforcing the model of an interlacement of the transseptal fibers in that region.

Key words: gingival. fourier transform. fractal analysis. picrosirius red. polarized light microscopy. transseptal fiber.

7 COMENTÁRIOS

As fibras transeptais desempenham um importante papel provendo suporte às estruturas gengivais e dentárias, protegendo o osso alveolar interproximal e estabilizando a posição dos dentes. Participam de eventos fisiológicos, como a migração dentária fisiológica, e terapêuticos como na movimentação dentária ortodôntica.

Os dentes são suportados pelo osso alveolar, ligamento periodontal, cemento e gengiva. A movimentação dentária seja fisiológica ou ortodôntica só é possível de ser alcançada e mantida mediante processos de remodelamento dessas estruturas teciduais de suporte. Dentre estas estruturas, as fibras transeptais são comumente responsabilizadas pela estabilização da posição dentária e pela recidiva dos movimentos ortodônticos devido à sua distribuição anatômica interligando todos os dentes do arco. Desta forma, as fibras transeptais podem sofrer influência ou influenciar o processo de movimentação dentária.

A metodologia de quantificação dos parâmetros histomorfométricos utilizada nesta pesquisa, pode ser aplicada para a avaliação das alterações histomorfológicas presentes nos eventos fisiológicos, patológicos e terapêuticos que induzam alterações das fibras transeptais como em estudos de movimentação dentária experimental.

Durante o presente trabalho, foi desenvolvido um cefalostato para ser usado em radiografias cefalométricas de ratos. Este dispositivo proporciona a padronização do posicionamento da cabeça do animal permitindo registrar a posição dentária em

radiografias com a subsequente mensuração da alteração da posição dos dentes em radiografias seqüenciais permitindo quantificar a movimentação dentária tendo igualmente aplicação em estudos de movimentação dentária induzida.

No presente estudo avaliamos o arranjo das fibras gengivais transeptais de ratos Wistar machos por meio de microscopia de luz polarizada e análise de imagens digitais. A metodologia empregada permitiu avaliar parâmetros histomorfométricos das fibras verificando-se que o arranjo das fibras transeptais é compatível com o conceito preconizado por Bernick (1960), Furstman e Bernick (1972) e Schacter e Bernick (1976) de que as fibras transeptais não são contínuas apresentando um entrelaçamento na região central do espaço interproximal de fibras provenientes dos dentes adjacentes.

É de grande valia dar prosseguimento com esta linha de pesquisa para elucidar a real estruturação das fibras transeptais. Acreditamos que trabalhos futuros seguindo esta linha devem ser conduzidos utilizando novas formas de avaliação como, por exemplo, a microscopia confocal e a modelagem matemática.

8 CONCLUSÃO

- 1) A intensidade de brilho das fibras transeptais apresentou-se semelhante ao longo da região ocupada pelas fibras transeptais demonstrando uma orientação homogênea das fibras ao longo do espaço interproximal.
- 2) As medidas de orientação das fibras transeptais não demonstraram diferença estatisticamente significativa, confirmando a orientação homogênea das fibras ao longo de toda a extensão mesio-distal.
- 3) Constatou-se diferença estatística significativa na densidade de ocupação das fibras transeptais, com uma densidade maior de fibras na região central quando comparada às regiões próximas aos dentes adjacentes.
- 4) Verificou-se diferença estatística significativa na dimensão fractal das fibras transeptais com a região central apresentando dimensão fractal maior quando comparada às regiões mesial e distal. O aumento da dimensão fractal demonstrou-se linearmente relacionado ao aumento da densidade de fibras, refletindo a maior quantidade de fibras na região central.
- 5) Demonstrou-se diferença no arranjo das fibras transeptais da região central em relação às regiões mesial e distal, desta forma, o modelo que melhor descreve o arranjo das fibras transeptais é aquele que preconiza um entrelaçamento na região central do espaço interproximal de fibras provenientes dos dentes adjacentes.

REFERÊNCIAS

- ARNIM, S. S.; HAGERMAN, D. A. The connective tissue fibers of the marginal gingiva. **Journal of the American Dental Association**, Chicago, v.47, n.3, p.271-81, 1953.
- AROKOSKI, J. P.; HYTTINEN, M. M.; LAPVETELAINEN, T.; TAKACS, P.; KOSZTACZKY, B.; MODIS, L.; KOVANEN, V.; HELMINEN, H. Decreased birefringence of the superficial zone collagen network in the canine knee (stifle) articular cartilage after long distance running training, detected by quantitative polarised light microscopy. **Annals of the rheumatic diseases**, London, v.55, n.4, p.253-64, 1996.
- AYRES, C.; BOWLIN, G. L.; HENDERSON, S. C.; TAYLOR, L.; SHULTZ, J.; ALEXANDER, J.; TELEMECO, T. A.; SIMPSON, D. G. Modulation of anisotropy in electrospun tissue-engineering scaffolds: Analysis of fiber alignment by the fast Fourier transform. **Biomaterials**, Guildford, v.27, n.32, p.5524-34, 2006.
- AYRES, C. E.; BOWLIN, G. L.; PIZINGER, R.; TAYLOR, L. T.; KEEN, C. A.; SIMPSON, D. G. Incremental changes in anisotropy induce incremental changes in the material properties of electrospun scaffolds. **Acta biomaterialia**, Kidlington, v.3, n.5, p.651-61, 2007.
- AYRES, C. E.; JHA, B. S.; MEREDITH, H.; BOWMAN, J. R.; BOWLIN, G. L.; HENDERSON, S. C.; SIMPSON, D. G. Measuring fiber alignment in electrospun scaffolds: a user's guide to the 2D fast Fourier transform approach. **Journal of biomaterials science. Polymer edition**, Utrecht, v.19, n.5, p.603-21, 2008.
- BERNICK, S. The organization of the periodontal membrane fibres of the developing molars of rats. **Archives of oral biology**, Oxford, v.2, May, p.57-63. 1960.
- BORGES, L. F.; GUTIERREZ, P. S.; MARANA, H. R.; TABOGA, S. R. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. **Micron**, Oxford, v.38, n.6, p.580-3, 2007.
- BROMAGE, T. G.; GOLDMAN, H. M.; MCFARLIN, S. C.; WARSHAW, J.; BOYDE, A.; RIGGS, C. M. Circularly polarized light standards for investigations of collagen fiber orientation in bone. **Anatomical record. Part B, New anatomist**, Hoboken, v.274, n.1, p.157-68, 2003.
- BURGER, W.; BURGE, M. **Digitale Bildverarbeitung: Eine Einführung mit Java und ImageJ**. Berlin: Springer. 2006. 515 p.

BURGER, W.; BURGE, M. **Digital image processing : an algorithmic introduction using Java**. New York: Springer. 2008. 564 p.

CHAUDHURI, S.; NGUYEN, H.; RANGAYYAN, R. M.; WALSH, S.; FRANK, C. B. A Fourier domain directional filtering method for analysis of collagen alignment in ligaments. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, New York, v.34, n.7, p.509-18, 1987.

CHAVRIER, C.; COUBLE, M. L.; MAGLOIRE, H.; GRIMAUD, J. A. Connective tissue organization of healthy human gingiva. Ultrastructural localization of collagen types I-III-IV. **Journal of periodontal research**, Munksgaard, v.19, n.3, p.221-9, 1984.

CHO, M. I.; GARANT, P. R. Development and general structure of the periodontium. **Periodontology 2000**, Danvers, v.24, p.9-27, 2000.

CROSS, S. S. The application of fractal geometric analysis to microscopic images. **Micron**, Oxford, v.25, n.1, p.101-13, 1994.

DE OLIVEIRA, R. S.; DE OLIVEIRA GUERRA, M.; PETERS, V. M.; VITRAL, R. W. A reliable positioning device for dorsoventral cephalometric radiography of the rat. **Lab Anim (NY)**, New York, v.37, n.3, p.127-31, 2008.

DEMERS, G.; GRIFFIN, G.; DE VROEY, G.; HAYWOOD, J. R.; ZURLO, J.; BEDARD, M. Animal research. Harmonization of animal care and use guidance. **Science (New York, N.Y.)**, New York, v.312, n.5774, p.700-1, 2006.

DOUGHERTY, G. **Digital image processing for medical applications**. Cambridge: Cambridge University Press. 2009, 447 p.

FALCONER, K. J. **Fractal geometry : mathematical foundations and applications**. Chichester: Wiley. 2003, 337 p.

FURSTMAN, L.; BERNICK, S. Clinical considerations of the periodontium. **American journal of orthodontics**, St. Louis v.61, n.2, p.138-55, 1972.

FUSELER, J. W.; MILLETTE, C. F.; DAVIS, J. M.; CARVER, W. Fractal and image analysis of morphological changes in the actin cytoskeleton of neonatal cardiac fibroblasts in response to mechanical stretch. **Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada**, New York, v.13, n.2, p.133-43, 2007.

GOLDMAN, H. M. The topography and role of the gingival fibers. **Journal of dental research**, v.30, n.3, p.331-6, 1951.

GOLDMAN, H. M.; BROMAGE, T. G.; THOMAS, C. D.; CLEMENT, J. G. Preferred collagen fiber orientation in the human mid-shaft femur. **The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology**, Hoboken, v.272, n.1, p.434-45, 2003.

HASSELL, T. M. Tissues and cells of the periodontium. **Periodontology 2000**, Danvers, v.3, p.9-38, 1993.

HEASMAN, P. A.; MILLETT, D. T.; CHAPPLE, I. L. **The periodontium and orthodontics in health and disease**. Oxford: Oxford University Press. 1996, 349 p.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical journal**, London v.11, n.4, p.447-55, 1979.

JUNQUEIRA, L. C.; MONTES, G. S. Biology of collagen-proteoglycan interaction. **Archivum histologicum Japonicum. Nippon soshikigaku kiroku**, Nigata v.46, n.5, p.589-629, 1983.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Basic histology : text & atlas**. New York: McGraw-Hill. 2005, 502 p.

KIM, A.; LAKSHMAN, N.; PETROLL, W. M. Quantitative assessment of local collagen matrix remodeling in 3-D culture: the role of Rho kinase. **Experimental cell research**, San Diego, v.312, n.18, p.3683-92, 2006.

KOMATSU, K.; MOSEKILDE, L.; VIIDIK, A.; CHIBA, M. Polarized light microscopic analyses of collagen fibers in the rat incisor periodontal ligament in relation to areas, regions, and ages. **The Anatomical record**, New York, v.268, n.4, p.381-7, 2002.

KOREN, R.; YANIV, E.; KRISTT, D.; SHVERO, J.; VELTMAN, V.; GRUSHKO, I.; FEINMESSER, R.; SULKES, J.; GAL, R. Capsular collagen staining of follicular thyroid neoplasms by picrosirius red: role in differential diagnosis. **Acta histochemica**, Jena, v.103, n.2, p.151-7, 2001.

KUSTERS, S. T.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M.; MALTHA, J. C. An experimental study in dogs of transseptal fiber arrangement between teeth which have emerged in rotated or non-rotated positions. **Journal of dental research**, v.70, n.3, p.192-7, 1991.

LANDINI, G. Applications of fractal geometry in pathology. In: P. M. LANNACCONE E M. K. KHOKHA (Ed.). **Fractal Geometry in Biological Systems: An Analytical Approach**. Boca Raton: CRC-Press, 1996, p.205-246.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Clinical periodontology and implant dentistry**. Oxford: Blackwell. 2003, 1044 p.

MONTES, G. S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. **Cell biology international**, London, v.20, n.1, p.15-27, 1996.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. Biology of collagen. **Revue canadienne de biologie expérimentale**, Montréal, v.41, n.2, p.143-56, 1982.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86 Suppl 3, p.1-11. 1991.

NANCI, A. **Ten Cate's oral histology: development, structure, and function**. St. Louis: Mosby, 2007, 411 p.

NARAYANAN, A. S.; PAGE, R. C. Connective tissues of the periodontium: a summary of current work. **Collagen and related research**, Stuttgart, v.3, n.1, p.33-64. 1983.

NARAYANAN, A. S.; PAGE, R. C.; MEYERS, D. F. Characterization of collagens of diseased human gingiva. **Biochemistry**, Easton, v.19, n.22, p.5037-43, 1980.

NEWMAN, M. G.; TAKEI, H. H.; CARRANZA, F. A. **Carranza's clinical periodontology**. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 2002, 1033 p.

OTSU, N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. **IEEE transactions on systems, man, and cybernetics**, New York, v.9, n.1, p.62-66, 1979.

PAGE, R. C.; AMMONS, W. F.; SCHECTMAN, L. R.; DILLINGHAM, L. A. Collagen fibre bundles of the normal marginal gingiva in the marmoset. **Archives of oral biology**, Oxford, v.19, n.11, p.1039-43, 1974.

PEITGEN, H.-O.; JÜRGENS, H.; SAUPE. **Chaos and fractals : new frontiers of science**. New York: Springer. 2004, 864 p.

PICKERING, J. G.; BOUGHNER, D. R. Quantitative assessment of the age of fibrotic lesions using polarized light microscopy and digital image analysis. **The American journal of pathology**, Hagerstown, v.138, n.5, p.1225-31, 1991.

PICTON, D. C.; MOSS, J. P. The part played by the trans-septal fibre system in experimental approximal drift of the cheek teeth of monkeys (*Macaca irus*). **Archives of oral biology**, Oxford, v.18, n.6, p.669-80, 1973.

POURDEYHIMI, B.; DENT, R.; DAVIS, H. Measuring fiber orientation in nonwovens .3. Fourier transform. **Textile Research Journal**, Lancaster, v.67, n.2, p.143-151, 1997.

PUCHTLER, H.; WALDROP, F. S.; VALENTINE, L. S. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. **Beiträge zur Pathologie**, Stuttgart, v.150, n.2, p.174-87, 1973.

REDLICH, M.; RAHAMIM, E.; GAFT, A.; SHOSHAN, S. The response of supraalveolar gingival collagen to orthodontic rotation movement in dogs. **American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics**, v.110, n.3, p.247-55, 1996.

REDLICH, M.; SHOSHAN, S.; PALMON, A.. Gingival response to orthodontic force. **American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics**, St. Louis, v.116, n.2, p.152-8, 1999.

RICH, L.; WHITTAKER, P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v.22, n.2, p.97-104, 2005.

SANDER, E. A.; BAROCAS, V. H. Comparison of 2D fiber network orientation measurement methods. **Journal of biomedical materials research. Part A**, Hoboken, v.88, n.2, p.322-31, 2009.

SCHACTER, R. I.; BERNICK, S. The development and maturation of the supracrestal fibers in nonhuman primates. **The Angle orthodontist**, v.46, n.4, p.351-60, 1976.

SCHROEDER, H. E.; LISTGARTEN, M. A. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. **Periodontology 2000**, Danvers, v.13, p.91-120, 1997.

SKINNER, R. A. Decalcification of Bone Tissue. In: Y. H. AN E K. L. MARTIN (Ed.). **Handbook of histology methods for bone and cartilage**. Totowa: Humana Press, 2003. Decalcification of Bone Tissue, p.167-184.

SMUKLER, H.; DREYER, C. J. Principal fibres of the periodontium. **Journal of periodontal research**, Munksgaard, v.4, n.1, p.19-25. 1969.

TAMBASCO, M.; COSTELLO, B. M.; KOUZNETSOV, A.; YAU, A.; MAGLIOCCO, A. M. Quantifying the architectural complexity of microscopic images of histology specimens. **Micron**, Oxford, v.40, n.4, p.486-94, 2009.

THILANDER, B. Biological basis for orthodontic relapse. **Seminars in orthodontics**, v.6, n.3, p.195-205, 2000.

WAYNE, R. O. **Light and video microscopy**. Boston: Academic Press/Elsevier, 2009, 289 p.

WHITTAKER, P.; KLONER, R. A.; BOUGHNER, D. R.; PICKERING, J. G. Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light. **Basic research in cardiology**, Darmstadt, v.89, n.5, p.397-410, 1994.

WU, Q.; MERCHANT, F. A.; CASTLEMAN, K. R.. **Microscope image processing**. Boston: Elsevier/Academic Press, 2008, 548 p.

XIA, Y.; ELDER, K. Quantification of the graphical details of collagen fibrils in transmission electron micrographs. **Journal of microscopy**, Oxford, v.204, n.Pt 1, p.3-16, 2001.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Artigo I - A reliable positioning device for dorsoventral cephalometric radiography of the rat	64
APÊNDICE B - Artigo II - Determinação do ponto de descalcificação para o preparo histológico de tecidos mineralizados	70
APÊNDICE C - Código I - Hanning Window	73
APÊNDICE D - Código II - Directional Filter Window	76
APÊNDICE E - Livro I - Fehler in Definition des Hanning-Fensters	80
APÊNDICE F - Livro II - Error in equation for Hanning windowing function.....	83
APÊNDICE G - Artigo - Histomorphometric analysis of the arrangement of transseptal fibers in rat gingiva	86

APÊNDICE A – Artigo I - A reliable positioning device for dorsoventral cephalometric radiography of the rat

A reliable positioning device for dorsoventral cephalometric radiography of the rat

Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira, MSc^{1,2}, Martha de Oliveira Guerra, MSc, PhD³, Vera Maria Peters, MSc, PhD³ & Robert Willer Farinazzo Vitral, MSc, PhD²

In dental research, dorsoventral cephalometric radiography is often used to assess skull growth and dental movement in rat models. To ensure that images can be reproduced, radiographers must use a cephalostat to maintain the rat's head in a consistent position across imaging sessions. The authors describe a positioning device they designed that connects easily to a standard dental X-ray machine. The device enabled researchers to position rats repeatedly for radiographic imaging with very little variation.

Cephalometric radiography is often used to assess craniofacial and dental structures in experimental rat models. Studies of cranial growth in the rat have used several radiographic views, including the lateral view^{1,2}, the oblique view³ and a combination of lateral and dorsoventral views^{4,5}. In studies that measure dental movement in the rat, the dorsoventral view is generally used^{6–10}.

No matter which radiographic view is selected, radiographers must maintain the following conditions across imaging sessions in order to produce consistent images that can be used in subsequent comparisons and measurements: (i) the imaging surface must be level; (ii) the distance between the object being radiographed and the film (object–film distance) must remain constant; (iii) the distance between the X-ray target and the film (target–film distance) must remain constant; (iv) spatial orientation of the object and the X-ray source must be consistent; and (v) the position of the animal's head must be consistent.

Radiographers must use a cephalostat to place and maintain the subject's head in a reproducible position. Longitudinal craniofacial studies in small animals require a simple and precise cephalostat¹¹.

Investigators in the field of brain research often use stereotaxic head holders to position animals^{12–18}. These devices may not be applicable to dental research, however, because they are designed to work with magnetic resonance imaging devices, and most of them incorporate an incisor bar^{12–14,16–18} that could obstruct the view of a dental segment.

Though several studies have used cephalometric radiography to appraise growth and dental movement

in rats, few have described in detail the orienting device that radiographers used to position the subject's head. In one study of mandibular growth, investigators produced lateral cephalometric radiographs of rats using a specially designed cephalostat, which was mounted on a conventional clinical lateral and posteroanterior cephalometric apparatus (Siemens, Munich, Germany)¹⁹. The cephalostat was made of Plexiglas and wood. Each rat was hung vertically by its upper incisors from a horizontal wooden post, with two posts placed against the rat's ear canals. Another study of craniofacial skeleton growth in wildtype Lewis rats used lateral and dorsoventral radiographs of the head and right foreleg³. The investigators stated that they used a specially designed apparatus to maintain rats' heads in a consistent position and at a constant point of contact with the film but did not describe the apparatus. In a third study of rat tooth movement, researchers used a head-holding device that contained ear rods for positioning the rat in *norma ventralis* (with the base of its head against the base of the cephalostat)⁶. The film was placed between the base of the device and the animal's head, and the device was placed on the floor. The target–film distance was 127 cm, with the central ray perpendicular to the base of the cephalostat. The paper did not describe how that distance was measured or how the orientation of the ray was obtained.

Little technical information exists on designing a cephalostat that is suitable for dental research, and researchers may not be able to purchase a specialized cephalometric apparatus that meets their needs.

¹Health Graduate Program at the School of Medicine, ²Orthodontics Department, ³Center of Reproductive Biology, Juiz de Fora Federal University, Minas Gerais, Brazil. Correspondence should be addressed to R.S.M.F.O (roberto@aparelho.com).

We describe a simple and inexpensive dorsoventral cephalometric positioning device that can be used with a standard dental X-ray machine.

METHODS

Rats

All experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Juiz de Fora Federal University, Brazil, and were carried out in accordance with the rules of the International Council for Laboratory Animal Science.

We used 12-week-old adult male albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*; $n = 10$), weighing 260–300 g. We obtained the rats from the vivarium of the Center of Reproductive Biology at our institution. We housed rats individually in polypropylene cages on ventilated racks with a light:dark cycle of 12 h:12 h, a temperature of 23 ± 2 °C and water and food *ad libitum*. The rats used in this study were also used as models in a pilot study of orthodontic tooth movement.

Positioning device

The positioning device (Fig. 1) consists of two separate units: the rat cephalostat (Fig. 1a) and the collimator unit (Fig. 1b).

Rat cephalostat. This unit is used to position the rat's head for the radiographic procedure. The cephalostat consists of an acrylic base (35.0 cm long \times 20.0 cm wide \times 0.4 cm high) with two vertical acrylic posts attached to it, 7.0 cm apart. The rat is placed on the cephalostat in *norma ventralis* with its head between the two posts. Each post holds a sliding stainless steel rod (0.3 cm diameter), which passes horizontally through a rod lock inserted in the post at a height that enables the tips of the rods to touch the rat's ear canals. These rods can slide back and forth, allowing the radiographer to adjust the position of the rat's head. When the desired position is obtained, each rod is locked in place with a knobbed screw. The tip of the rod that touches the rat's ear is covered with a soft polymer cap.

Four screws are arranged in a rectangle around the center of the cephalostat and are attached perpendicularly to the acrylic base with nuts and washers. A small cylindrical neodymium magnet (9 mm diameter \times 1 mm high) is glued to a nut at the top of each screw (Fig. 1d).

Collimator unit. This unit enables the cephalostat to be easily connected to the X-ray machine. Its principal component is an X-ray collimator cylinder (5.8 cm inner diameter \times 15.0 cm high), which filters X-rays in order to produce a clear image. A second component is an acrylic

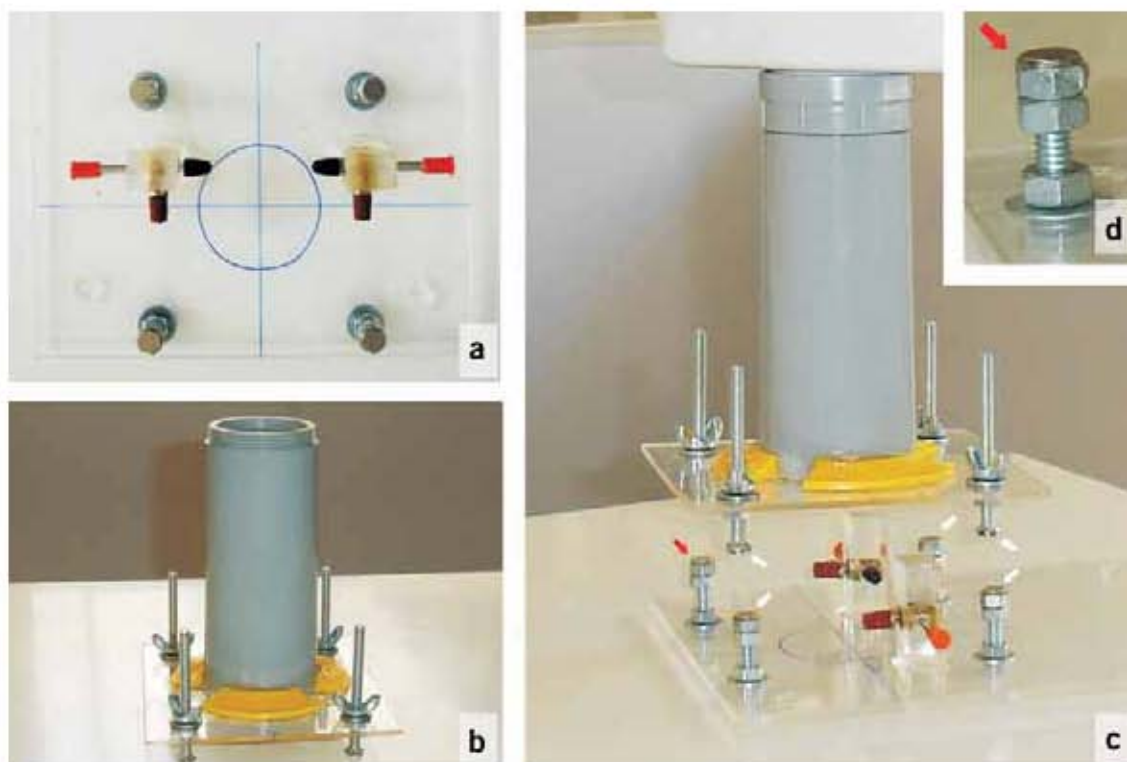


FIGURE 1 | The positioning device. (a) The rat cephalostat (top view). Lines are drawn to center the film packet and the rat's midsagittal plane. (b) The collimator unit. A cylindrical collimator, removed from the X-ray head, is glued perpendicularly to the acrylic base. Wing nuts allow the height of the base to be adjusted. (c) The collimator screwed onto the head of the X-ray machine. Magnets (arrows) enable the cephalostat to be easily connected to and disconnected from the collimator unit. (d) Close-up of a cylindrical neodymium magnet (9.0 mm diameter \times 1.0 mm high) glued to a nut at the end of a screw (arrow).

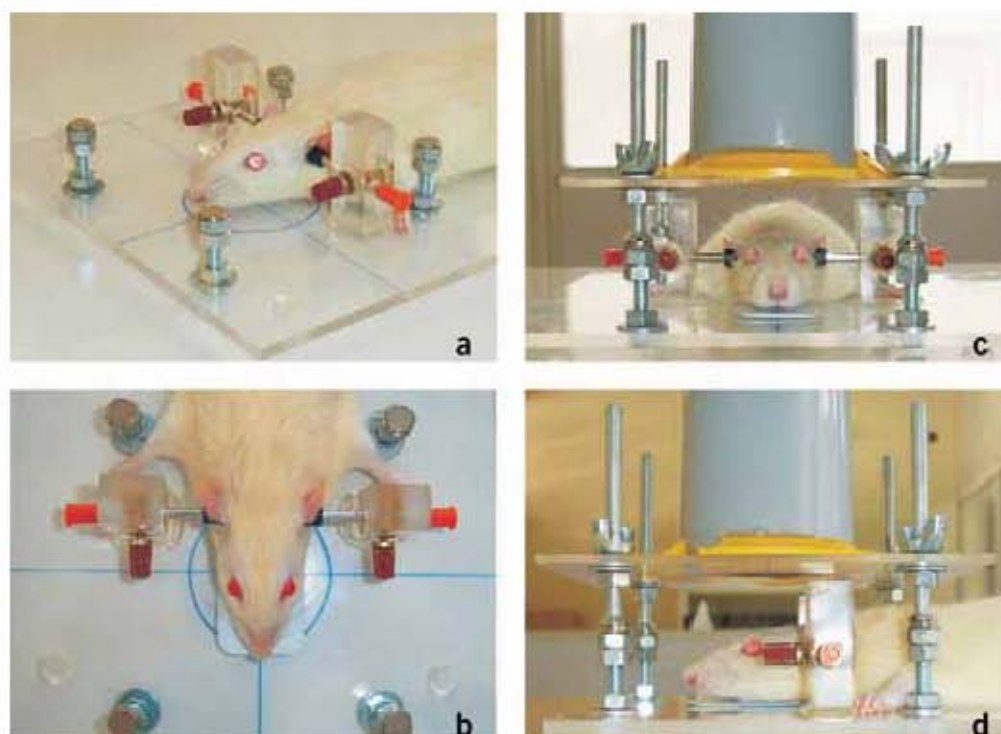


FIGURE 2 | Positioning of the rat in the cephalostat. (a) The anesthetized rat positioned in the cephalostat. (b) Ear rods are used to center the rat's head and to keep it in place. The radiographic film is placed between the head and the base of the cephalostat (top view). (c) Frontal view of the rat on the fully assembled device. The cephalostat is joined to the collimator of the X-ray machine with magnets. (d) Lateral view of the rat on the fully assembled device.

base that contains a circular hole with the same diameter as that of the cylinder. The cylinder is placed vertically over the hole in the acrylic base and is fixed to the base with epoxy glue. Four screws are arranged around the center of the cylinder, in positions that match the positions of the screws in the base of the cephalostat. The screws are attached to the acrylic base with wing nuts and washers, allowing the base to be easily raised or lowered to adjust the target–film distance. As in the cephalostat unit, a small cylindrical neodymium magnet (9 mm diameter \times 1 mm high) is glued to a nut at the top of each screw. The magnets allow this unit to easily connect to and disconnect from the cephalostat (Fig. 1c).

Validation of the positioning device

Before radiographing the rats, we anesthetized them with an intraperitoneal injection of xylazine (10 mg per kg body weight) and ketamine (90 mg per kg body weight).

We placed each anesthetized rat on the cephalostat in *norma ventralis*, using the rods to position and stabilize its head (Fig. 2a). We placed E-speed radiographic film (Kodak, Rochester, NY; film size 2, 3.0 cm \times 4.0 cm) between the rat's head and the base of the cephalostat (Fig. 2b). We then attached the cephalostat to the collimator unit using the magnets as described above (Fig. 2c,d). We used a Spectro 70X Electronic dental X-ray machine (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) with the

following settings: peak kilovoltage was 70 kVp, electric current was 8 mA, exposure time was 0.6 s and target–film distance was 25 cm.

To assess reproducibility, we detached the cephalostat from the collimator unit after each radiographic exposure. We then completely removed the rat from the cephalostat. We continued to repeat the entire procedure until we obtained 10 radiographs for each rat. We scanned the developed film onto a personal computer with a Microsoft Windows operating system.

Each rat had previously been fitted with two stainless steel wire markers (approximately 2 mm long, 0.41 mm diameter), which were bonded with dental adhesive to the occlusal surface of the first and second right maxillary molars (Fig. 3a). For each digitized radiograph (Fig. 3b), we measured the linear distance between the metallic markers using ImageJ software (version 1.37u; National Institutes of Health, Bethesda, MD; Fig. 3c). We calculated the mean, s.d., s.e. and variation coefficient of the distance between the markers in the radiographs of each rat to assess whether the rat's position had been successfully reproduced.

RESULTS

We prepared rats for radiography 100 times (10 radiographs for each of 10 rats). It was easy for us to position rats in the cephalostat, and the magnets proved to be a



FIGURE 3 | Radiograph and image processing. (a) Two metallic markers bonded on the occlusal surface of a rat's first and second right maxillary molars (arrow). (b) Complete digitized radiograph of the rat's head. (c) Screen shot of a radiographed image in ImageJ software, showing the measurement of the linear distance between the metallic markers (arrow). The image is enlarged 2×.

quick and reliable method of connecting the two parts of the positioning device. All radiographs showed the target area clearly and were used in the evaluation.

The validation data we obtained are summarized in **Table 1**. The coefficient of variation for the distance between the metallic markers for each rat was low (0.50–1.49%).

In addition, we visually inspected rats each time we removed them from the cephalostat and once again when they recovered from anesthesia. We did not note any injury to rats' ears.

DISCUSSION

A cephalostat must ensure that the head of a radiographed subject is maintained in an accurate and stable position. The cephalostat we designed uses two rods to hold a rat's head in a firm and constant position without causing trauma to the rat. Our data show that the device was effective in minimizing variation in linear measurements of the repeated radiographs of all rats. Such variation has previously been associated with changes in animal positioning, differences in anatomical landmark size or difficulties in landmark identification¹¹.

The positioning device we developed overcomes certain drawbacks of other similar tools. One study, for example, described a cephalostat that was designed to

view the lateral aspect of skull development in the living rat¹. In this case, a standard dental X-ray machine was clamped to a bracket attached to the animal table. This design limited the position of the X-ray source and of the film. In contrast, the cephalostat we developed enables more flexibility: it connects to a removable collimator that fits directly onto an X-ray machine, essentially transforming a standard dental X-ray machine into a cephalometric unit.

TABLE 1 | Linear measurements of the distance between metallic markers in the mouths of each rat, obtained from repeated dorsoventral cephalometric radiographs (n = 10 for each rat)

Rat	Mean (mm)	s.d. (mm)	s.e.	Variation coefficient (%)
1	3.95	0.02	0.01	0.50
2	3.31	0.05	0.02	1.49
3	3.51	0.03	0.01	0.98
4	3.36	0.03	0.01	1.00
5	4.89	0.05	0.01	0.93
6	3.48	0.02	0.01	0.54
7	4.39	0.04	0.01	0.98
8	4.21	0.05	0.01	1.08
9	3.67	0.03	0.01	0.85
10	3.23	0.04	0.01	1.24

Our device also addresses the need to achieve a level imaging surface. One group of researchers placed their positioning device on the floor and adjusted the base of the device with four height adjustment knobs and a spirit level⁶. We could not use this approach because we used a movable column X-ray machine and the floor in our laboratory was not level. Attaching the cephalostat base to the collimator enabled us to preserve a level imaging surface and to achieve a fixed target–film distance with the central ray perpendicular to the film, despite poor floor leveling.

The neodymium magnets allowed radiographers to easily release the cephalostat from the collimator in order to position the rat and to quickly reassemble the device for radiography. The magnetic force was strong enough to hold the cephalostat with the rat in place without requiring contact with the worktable.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) and by Rede Mineira de Bioterismo (grant number REDE2824/05). R.S.M.F.O. was supported by FAPEMIG.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare no competing financial interests.

Received 16 July; accepted 3 October 2007

Published online at <http://www.labanimal.com/>

- Spence, J.M. Method of studying the skull development of the living rat by serial cephalometric Roentgenograms. *Angle Orthod.* **10**, 127–139 (1940).
- Singleton, D.A., Buschang, P.H., Behrents, R.G. & Hinton, R.J. Craniofacial growth in growth hormone-deficient rats after growth hormone supplementation. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* **130**, 69–82 (2006).
- Killiany, D.M., Johnson, O.N. & Johnston, L.E. Jr. Combined cephalometric and transcranial radiography of the rat condyle. *Angle Orthod.* **57**, 162–167 (1987).
- VandeBerg, J.R., Buschang, P.H. & Hinton, R.J. Absolute and relative growth of the rat craniofacial skeleton. *Arch. Oral. Biol.* **49**, 477–484 (2004).
- Cesani, M.F. *et al.* Growth of functional cranial components in rats submitted to intergenerational undernutrition. *J. Anat.* **209**, 137–147 (2006).
- King, G.J., Keeling, S.D., McCoy, E.A. & Ward, T.H. Measuring dental drift and orthodontic tooth movement in response to various initial forces in adult rats. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* **99**, 456–465 (1991).
- Gibson, J.M., King, G.J. & Keeling, S.D. Long-term orthodontic tooth movement response to short-term force in the rat. *Angle Orthod.* **62**, 211–215 (1992).
- King, G.J., Archer, L. & Zhou, D. Later orthodontic appliance reactivation stimulates immediate appearance of osteoclasts and linear tooth movement. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* **114**, 692–697 (1998).
- Hayashi, H., Konoo, T. & Yamaguchi, K. Intermittent 8-hour activation in orthodontic molar movement. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* **125**, 302–309 (2004).
- Madan, M.S., Liu, Z.J., Gu, G.M. & King, G.J. Effects of human relaxin on orthodontic tooth movement and periodontal ligaments in rats. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* **131**, 8.e1–10 (2007).
- Mostafa, Y.A. & Carian, A.P. A cephalostat for small animals. *Angle Orthod.* **51**, 241–245 (1981).
- Fricke, S.T. *et al.* Consistent and reproducible slice selection in rodent brain using a novel stereotaxic device for MRI. *J. Neurosci. Methods* **136**, 99–102 (2004).
- Karger, C.P., Hartmann, G.H., Hoffmann, U. & Lorenz, W.J. A system for stereotactic irradiation and magnetic resonance evaluations in the rat brain. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **33**, 485–492 (1995).
- Kamiyo, T., Berr, S.S., Lee, K.S., Kassell, N.F. & Steiner, L. Enhanced magnetic resonance imaging of the rat brain using a stereotactic device with a small head coil: technical note. *Acta Neurochir. (Wien)*. **133**, 87–92 (1995).
- Khubchandani, M., Mallik, H.N., Jagannathan, N.R. & Mohan Kumar, V. Stereotaxic assembly and procedures for simultaneous electrophysiological and MRI study of conscious rat. *Magn. Reson. Med.* **49**, 962–967 (2003).
- Lahti, K.M., Ferris, C.F., Li, F., Sotak, C.H. & King, J.A. Imaging brain activity in conscious animals using functional MRI. *J. Neurosci. Methods* **82**, 75–83 (1998).
- Ohl, F. *et al.* Volumetric MRI measurements of the tree shrew hippocampus. *J. Neurosci. Methods* **88**, 189–193 (1999).
- Wolf, O.T. *et al.* Volumetric measurement of the hippocampus, the anterior cingulate cortex, and the retrosplenial granular cortex of the rat using structural MRI. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* **10**, 41–46 (2002).
- Tsolakis, A.I., Spyropoulos, M.N., Katsavrias, E. & Alexandridis, K. Effects of altered mandibular function on mandibular growth after condylectomy. *Eur. J. Orthod.* **19**, 9–19 (1997).

**APÊNDICE B – Artigo II - Determinação do ponto de descalcificação para o
preparo histológico de tecidos mineralizados**

Nota Técnica

Determinação do ponto de descalcificação para o preparo histológico de tecidos mineralizados.

Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira^a, Vera Maria Peters^b, Robert Willer Farinazzo Vitral^b

a - Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Saúde da UFJF, Bolsista FAPEMIG;

b - Professor Doutor da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

O exame histológico ou histopatológico de tecidos mineralizados como dente ou osso requer o emprego de agentes descalcificadores como ácidos fracos (fórmico, pícrico ou acético), ácidos fortes (nítrico ou hidrocloreídrico) ou quelantes como o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Estes agentes têm a finalidade de promover a desmineralização ou descalcificação dos tecidos permitindo seu corte no micrótomo. A escolha do agente descalcificador está relacionada à urgência do exame ou à necessidade da técnica. Ácidos fortes, mesmo em concentrações baixas, promovem uma rápida descalcificação enquanto que com os ácidos fracos e os quelantes este processo é mais lento podendo chegar a vários meses. A descalcificação rápida pode introduzir artefatos como distorção do tecido devido à sua contração ou mesmo dificultar o processo de coloração. Para minimizar os efeitos adversos da descalcificação rápida é importante evitar a exposição prolongada ao ácido interrompendo o processo quando todo o cálcio for removido do tecido. Vários métodos de determinação do ponto final de descalcificação podem ser utilizados para o controle do procedimento de descalcificação. O Quadro 1 relaciona estes métodos apresentando suas vantagens e desvantagens. A escolha do melhor método depende da disponibilidade de recursos técnicos e de material.

Quadro 1 – Métodos de determinação do ponto de descalcificação

Método	Descrição	Vantagens	Desvantagens
Teste Químico	Reação química para testar a presença de cálcio na solução	Precisão	Os testes variam de acordo com o tipo de descalcificador. Alguns tipos de agentes descalcificadores não permitem o uso deste teste.
Tempo de Imersão	Tempo estimado pelo fabricante da solução descalcificadora ou pelo estabelecimento de protocolos próprios	Funciona relativamente bem para amostras semelhantes	Imprecisão. Pode causar deficiências na coloração
Método mecânico	Dobrar ou sondar a peça	Método rápido e direto	Produz artefatos e distorções
Radiografia	Identificação da presença de cálcio pela obtenção de radiografia do tecido.	Simplicidade e precisão	Alto custo de equipamentos (aparelho de Raios-X) e consumíveis
Medida da Alteração de peso	Utiliza-se balança de precisão de suspensão, traça-se curva de perda de peso através de registro manual ou automático (balança + computador)	Precisão	Necessidade de Equipamentos especializados e cálculos matemáticos

Referências

Bancroft, J. D. e H. C. Cook. **Manual of histological techniques and their diagnostic applications**. Edinburgh ; New York: Churchill Livingstone. 1994

Fernandes, M. I., E. J. Gaio, *et al.* Microscopic qualitative evaluation of fixation time and decalcification media in rat maxillary periodontium. **Braz. oral res**, v.21, n.2, p.134-139. 2007.

Mawhinney, W. H., E. Richardson, *et al.* Control of rapid nitric acid decalcification. **J Clin Pathol**, v.37, n.12, Dec, p.1409-13. 1984.

Skinner, R. A. Decalcification of Bone Tissue. In: Y. H. An e K. L. Martin (Ed.). **Handbook of histology methods for bone and cartilage**. Totowa, NJ: Humana Press, 2003. Decalcification of Bone Tissue, p.167-184

APÊNDICE C – Código I - Hanning Window

```
/* ImageJ Macro "Hanning Window"
```

Authors: Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira, Vera Maria Peters, Robert Willer Farinazzo Vitral
 Address: Universidade Federal de Juiz de Fora - Brazil
 Email: R.Sotto-Maior (roberto at aparelho dot com)

This Macro generates a Hanning Window Function Image to be used in Discrete Fourier Transform computing applications. The windowing function image size should be informed in the dialog Window. This code produces a 32 bit image Hanning Window with equal height and width dimensions.

References:

Burger, W., Burge, M., 2008. Digital image processing: an algorithmic introduction using Java, 1st ed. Springer, New York. p.352-358.
 R.Sotto-Maior. Errata. Table 14.3: error in equation for Hanning windowing function. <http://www.imagingbook.com/fileadmin/en/errata1/ch14-355.pdf>.

Acknowledgement: The support from FAPEMIG (Fundacao de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais) is gratefully acknowledged.

History: 2009/7/25: First version

```
*/
```

```
macro "Hanning Window" {

Dialog.create("Hanning Window");
Dialog.addNumber("Window size:", 512);
Dialog.show();
size = Dialog.getNumber();

setBatchMode(true);
newImage("Hanning Window", "32-bit Black", size, size, 1);
M=size;
N=size;

for (v=0; v<N; v++) {
  showProgress(v, N);
  for (u=0; u<M; u++) {
    ru=2*u/M-1;
    rv = 2*v/N-1;
    ruv=pow(ru,2)+pow(rv,2);
    ruv = sqrt(ruv);
    wuv = 0.5*(cos(PI*ruv)+1);
    if (ruv >= 0 && ruv < 1)
      setPixel(u, v, 1*wuv);
    else
      setPixel(u, v, 0);
  }
}
setBatchMode(false);
}
```

APÊNDICE D – Código II - Directional Filter Window

```
/* ImageJ Macro "Directional Filter Window"
```

Authors: Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira, Vera Maria Peters, Robert Willer Farinazzo Vitral

Address: Universidade Federal de Juiz de Fora - Brazil

Email: R.Sotto-Maior (roberto at aparelho dot com)

This Macro generates a filter window image to be used in Fourier Domain Directional Filtering applications.

The filter image size, the angles band θ_1 and θ_2 , and the α coefficient should be informed in the dialog Window.

The angle parameters should be entered in degrees.

This code produces a 32 bit image Directional Filter Window with equal height and width dimensions.

Reference:

Chaudhuri S, et al. A Fourier domain directional filtering method for analysis of collagen alignment in ligaments. IEEE Trans. Biomed. Eng. 1987 Jul;34(7):509-18.

Acknowledgement: The support from FAPEMIG (Fundacao de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais) is gratefully acknowledged.

History: 2009/6/18: version 0.1 - First version

2009/11/5: version 0.2 - The first version was replaced to a corrected code that generate filters of fixed value bandwidth ($\pi/2$).

2009/11/12: version 1.0

Now the code work as suggested by Chaudhuri et al. (1987) with no bandwidth limitation.

Its is necessary to enter the bandwidth limits (θ_1, θ_2) angles with $\theta_1 < \theta_2$.

The bandwidth is now calculated by the code.

The angle signal convention is the same used by the atan2 macro function.

```
*/
```

```
macro "Directional Filter Window" {
```

```
Dialog.create("Directional Filter Window");
Dialog.addNumber("Filter image size (pixel):", 512);
Dialog.addNumber("Theta1 (degree):", 45);
Dialog.addNumber("Theta2 (degree):", 135);
Dialog.addNumber("Alpha Coefficient:", 1);
Dialog.show();
```

```
size = Dialog.getNumber();
theta1 = Dialog.getNumber();
theta2 = Dialog.getNumber();
alpha = Dialog.getNumber();
```

```
theta1 *= PI/180;
```

```
theta2 *= PI/180;
```

```

theta0 = (theta2+theta1)/2;
bandwidth = theta2-theta1;

if (theta1 >= theta2)
exit("You entered theta1 > theta2. Please enter theta1 < theta2.");
if (abs(bandwidth) >= PI)
exit("The bandwidth [theta2 - theta1] should be < 180.");

M=size;
N=size;
setBatchMode(true);
newImage("Directional Filter Window", "32-bit Black", M, N, 1);

for (y=0; y<N; y++) {
    showProgress(y,N);
    for (x=0; x<M; x++) {

dx = x-M/2;
dy = y-N/2;

theta = atan2(dy, dx);
w = pow(cos(PI*(theta-theta0)/bandwidth), alpha);

if (theta1>=0){

    if ((theta >= theta1) && (theta <= theta2)){
        setPixel(x,y,w);
        setPixel(x-2*dx,y-2*dy,w);
        setPixel(M/2,N/2,0);
    }

}

if ((theta1<0) && (theta2>0)){

    if ((theta >= theta1) && (theta <= theta2)) {
        setPixel(x,y,w);
        setPixel(x-2*dx,y,w);
        setPixel(M/2,N/2,0);
    }

}

if ((theta1<=0) && (theta2<=0)){

    if ((theta >= theta1) && (theta <= theta2)) {
        setPixel(x,y,w);
        setPixel(x-2*dx,y-2*dy,w);
        setPixel(M/2,N/2,0);
    }

}

}

}

setBatchMode(false);
}

```

APÊNDICE E – Livro I - Fehler in Definition des Hanning-Fensters

Digital Image Processing

An algorithmic introduction using Java

Burger
& Burge

Springer Verlag



Deutsch

- Vorwort
- Inhalt
- Autoren
- Errata
- Java Code
- Bilder
- Lehrmaterial
- Links
- Leserkommentare
- zur 1. Auflage

English

Errata

Leider bleiben trotz größter Sorgfalt immer wieder Fehler vor dem Druck eines Buchs unentdeckt. Nachfolgend finden Sie die zugehörigen Korrekturen in Form von PDF-Dateien für die **einzelnen** Austauschseiten. Wir bedanken uns bei den Lesern für ihre genaue Durchsicht und die konstruktiven Kommentare. Falls Sie selbst auf bisher nicht registrierte Fehler aufmerksam werden, ersuchen wir um Rückmeldung an [imagingbook\(at\)gmail.com](mailto:imagingbook(at)gmail.com).

Fehlerliste mit Austauschseiten

Innerhalb der Austauschseiten (PDF download durch Klick auf die zugehörige Seitennummer) sind die Fehlerstellen **farbig** markiert.

KAP	SEITE	FEHLER	GEFUNDEN VON
1	--		
2	8	Fußnote: "Brunoleschi" hieß in Wirklichkeit "Brunelleschi".	Matt Jakob
3	33	setup()-Methode: "... Parameter ... imp" sollte "img" heißen.	Harald Krauss
3	37	Aufg. 3.5: Format der PGM-Datei sollte "plain" sein.	Wolfgang Lux
4	--		
5	59	Gl. 5.6: $a_{\min} + \dots$ (fehlt)	WB
	61	Gl. 5.10: $a_{\min} + \dots$ (fehlt in 2. Klausel)	Sven Bone
	84	Tab. 5.3: AVERAGE $ip1 \leftarrow (ip1 + ip2) / 2$	Wolfgang Lux
6	115	Formatierung: <code>ij.plugin.filter.RankFilters</code>	WB
	116	Aufg. 6.10: Fehler in LoG-Formel	WB
7	124	Die Filterkerne in Gl. 7.17 sind die des <i>Robinson-Operators</i> (<i>nicht</i> des <i>Kirsch-Operators</i>).	Chih-Cheng Hung
8	143	Alg. 8.1/Zeile 20: " $q_c > q_i$ " ersetzt durch " $q_c \geq q_i$ "	Daniel Blaser
9	--		
10	175	Gl. 10.4: (u',v') ersetzt durch (u,v)	WB
11	210	Alg. 11.3 (Zeile 13, 24, 29): L durch L_c ersetzt.	J. Weinstein
	214	In Java haben <i>boolean</i> -Objekte 32 bits.	MB
	229	Absatz nach Gl. 11.28: N_L sollte N_E (Euler-Zahl) heißen.	Marc Hensel
12	265	Gl. 12.33: $G = \dots$ ersetze w_k durch w_R	WB
	268	Formatierung/Numerierung der 1. Gleichung (Gl. 12.39)	WB
	269	Gleichungsnummern (im Text und Abb. 12.19)	WB
	273	Beschreibung von D50 Normlicht nicht korrekt (kein Glühlampenlicht!)	G. Ramsebner
	289	Gl. 12.67, 3. Zeile: Histogramm-Koordinaten (r,b) ersetzt durch (g,b)	Alexandra Ion
13	307	Tab. 13.1 (2. Zeile): +/- in Gleichung für Sinusfunktion vertauscht	Marc Hensel
	308	Abb. 13.3 (b,d): +/- in Gleichung für Sinusfunktionen vertauscht	Marc Hensel
	315	Abb. 13.7: Beschriftung der Intervalle (" τ " bzw. " π ")	Volker Christian
14	339	Abb. 14.6: Spiegelung von b nach b' ist falsch (neue Grafik!)	Wolfgang Konen
	343	Tab. 14.1: Fehler in Definition des Hanning-Fensters	R. Sotto-Maior
	354	in Aufg. 14.1: "... Abschn. 14" -> "... Abschn. 14.1.2"	WB
15	--		
16	365	Gl. 16.7/8: Vorzeichen der $\sin()$ -Terme vertauscht.	WB
	393	Typfehler in Abb. 16.28 (u_0, v_0).	W. Windsteiger
17	414	"..quadratische Summe" -> "..Summe der quadratischen.."	WB
	421	Programm 17.1: Deklaration der Variable kR fehlt; Fehler in Caption	Breuer
	426	Gl. 17.20: $D(r+i,s+i)$ sollte heißen $D(r+i,s+j)$.	Rainer Posch
A	--		
B	--		
C	446	IJprefx.txt -> IJ_Prefs.txt	Harald Krauss
D	485	Methode <code>isLocalMax</code> : " $cp > \dots$ " ersetzt durch " $cp \geq \dots$ " (s. Kap.8 / S. 143)	

Definitionen:	
$r_u = \frac{u-M/2}{M/2} = \frac{2u}{M} - 1, \quad r_v = \frac{v-N/2}{N/2} = \frac{2v}{N} - 1, \quad r_{u,v} = \sqrt{r_u^2 + r_v^2}.$	
Elliptisches Fenster:	$w(u, v) = \begin{cases} 1 & \text{für } 0 \leq r_{u,v} \leq 1 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$
Gauß-Fenster:	$w(u, v) = e^{\left(\frac{-r_{u,v}^2}{2\sigma^2}\right)}, \quad \sigma = 0.3 \dots 0.4$
Supergauß-Fenster:	$w(u, v) = e^{\left(\frac{-r_{u,v}^n}{\kappa}\right)}, \quad n = 6, \kappa = 0.3 \dots 0.4$
Kosinus²-Fenster:	$w(u, v) = \begin{cases} \cos\left(\frac{\pi}{2}r_u\right) \cdot \cos\left(\frac{\pi}{2}r_v\right) & \text{für } 0 \leq r_u, r_v \leq 1 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$
Bartlett-Fenster:	$w(u, v) = \begin{cases} 1 - r_{u,v} & \text{für } 0 \leq r_{u,v} \leq 1 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$
Hanning-Fenster:	$w(u, v) = \begin{cases} 0.5 \cdot [\cos(\pi r_{u,v}) + 1] & \text{für } 0 \leq r_{u,v} \leq 1 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$
Parzen-Fenster:	$w(u, v) = \begin{cases} 1 - 6r_{u,v}^2 + 6r_{u,v}^3 & \text{für } 0 \leq r_{u,v} < 0.5 \\ 2 \cdot (1 - r_{u,v})^3 & \text{für } 0.5 \leq r_{u,v} < 1 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$

14.3 FREQUENZEN UND ORIENTIERUNG IN 2D

Tabelle 14.1

2D-Fensterfunktionen. Die Funktionen $w(u, v)$ sind jeweils in der Bildmitte zentriert, d. h. $w(M/2, N/2) = 1$, und beziehen sich auf die Radien r_u, r_v und $r_{u,v}$ (Definitionen am Tabellenkopf).

Spektralkomponenten zwar deutlicher hervortreten, aber auch in der Breite zunehmen und damit schlechter zu lokalisieren sind.

APÊNDICE F – Livro II - Error in equation for Hanning windowing function



Digital Image Processing

An algorithmic introduction using Java

Burger
& Burge

Springer Verlag

Deutsch

English

NEW - Student Edition

Professional Edition

Preface

Contents

Errata

Slide Material

Java Code

Images

Authors

Reader Comments

ImageJ Tutorial

Links

Errata

We ask readers to report errors found in this text to [imagingbook\(at\)gmail.com](mailto:imagingbook(at)gmail.com).

List of known problems

Download corrections as PDFs by selecting the corresponding page numbers below. Inside each page, changes are marked (colored) individually.

CHAP	PAGE	ERROR	REPORTED BY
1	--		
2	8	Footnote: "Brunoleschi" should be "Brunelleschi".	Matt Jakob
3	--		
3	--		
4	--		
5	62	Eq. 5.12: $H(i)$ under square root should be replaced by $h(j)$.	Fu Jie Huang
6	95	Line 1: "rows" and "columns" must be exchanged.	Fu Jie Huang
	116	Exercise 6.12: ... "-sigma^2" should be "-2 sigma^2".	Jack Weinstein
7	125	Eq. 7.24: factor j was missing.	Gino Brunetti
8	--		
9	--		
10	--		
11	204	<i>Propagating labels</i> (last paragraph): foreground/background mixed up - $I(u,v)=0$ is background, $I(u,v)=1$ is foreground.	Jack Weinstein
	208	Caption to Fig. 11.3: "In the next step, (c) is exactly ..." should be "In the next step (c), there is exactly ...".	Jack Weinstein
	212	Item 2, Case A: "...transition from a <i>foreground</i> pixel ..." (not <i>background</i>)	Eitan Suez
	213	Implementation variables should be: I (pixelArray) and LM (labelArray).	WB
	214	Alg. 11.3 (lines 13, 24, 29): current line label should be L_k .	Jack Weinstein
	215	Alg. 11.4 (line 1): line label should be L_c .	Jack Weinstein
	223	Footnote: ImageJ's "Analyze" tools apparently do <i>not</i> use the described method for computing a region's perimeter.	Gabriel Landini
12	255	Printing problems in Fig. 12.9. Vertical axis in HSV-diagrams should be "V"	Ray S. Babcock
	260	Eq. 12.12: error in definition of C_{rng}	Lars Knipping
13	320	Table 13.1 (2nd row): exchange +/- in equation for Sine functions.	Marc Hensel
	322	Fig. 13.3 (b,d): exchange +/- in equation for Sine functions.	Marc Hensel
14	355	Table 14.3: error in equation for Hanning windowing function	R. Sotto-Maior
15	--		
16	385	Unclear column separation in matrix M of Eqns. 16.36 and 16.37.	Marc Hensel
	401	Eq. 16.58: expression for the first case ($0 \leq x < 1$) should end with ... +4 (not -4).	Eric Livio
	411	Typo in Fig. 16.32 (u_0, v_0).	W. Windsteiger
17	--		
A	--		
B	--		
C	479	Missing parentheses around arguments of first two constructor methods for <code>FloatProcessor</code> .	Hendrix Demers
D	--		

Definitions:	
$r_u = \frac{u-M/2}{M/2} = \frac{2u}{M} - 1 \quad r_v = \frac{v-N/2}{N/2} = \frac{2v}{N} - 1 \quad r_{u,v} = \sqrt{r_u^2 + r_v^2}$	
Elliptical window:	$w(u, v) = \begin{cases} 1 & \text{for } 0 \leq r_{u,v} \leq 1 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$
Gaussian window:	$w(u, v) = e^{\left(\frac{-r_{u,v}^2}{2\sigma^2}\right)}, \quad \sigma = 0.3 \dots 0.4$
Super-Gaussian window:	$w(u, v) = e^{\left(\frac{-r_{u,v}^n}{\kappa}\right)}, \quad n = 6, \kappa = 0.3 \dots 0.4$
Cosine² window:	$w(u, v) = \begin{cases} \cos\left(\frac{\pi}{2}r_u\right) \cdot \cos\left(\frac{\pi}{2}r_v\right) & \text{for } 0 \leq r_u, r_v \leq 1 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$
Bartlett window:	$w(u, v) = \begin{cases} 1 - r_{u,v} & \text{for } 0 \leq r_{u,v} \leq 1 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$
Hanning window:	$w(u, v) = \begin{cases} 0.5 \cdot [\cos(\pi r_{u,v}) + 1] & \text{for } 0 \leq r_{u,v} \leq 1 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$
Parzen window:	$w(u, v) = \begin{cases} 1 - 6r_{u,v}^2 + 6r_{u,v}^3 & \text{for } 0 \leq r_{u,v} < 0.5 \\ 2 \cdot (1 - r_{u,v})^3 & \text{for } 0.5 \leq r_{u,v} < 1 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$

14.3 FREQUENCIES AND ORIENTATION IN 2D

Table 14.1

2D windowing functions. The functions $w(u, v)$ have their maximum values at the image center, $w(M/2, N/2) = 1$. The values r_u , r_v , and $r_{u,v}$ used in the definitions are specified at the top of the table.

APÊNDICE G – Artigo - Histomorphometric analysis of the arrangement of transseptal fibers in rat gingiva

Abstract

The transeptal fibers are located in the lamina propria of the gingiva between adjacent teeth. They are often described as a group of collagen fibers embedded in the cementum of one tooth that follows a straight path over the alveolar bone crest and embeds itself in the cementum of the adjacent tooth. In a distinct way, it was reported that the transeptal fibers are not continuous over its full length but originates from the adjacent teeth interlacing in the central area of the interproximal gingiva. The present study aimed to evaluate and quantitate the gingival transseptal fibers arrangement by histomorphometry and histochemistry of sagittally cut tissue sections of the interdental region between first and second maxilar molar teeth of 12 male Wistar rat. The collagen fibers were stained with Picrosirius red staining and assessed with linear polarized light microscopy, digital image processing and analysis based on Fourier transform measurements and filtering techniques. In three different areas of the interdental gingiva, we measured histomorphometrical parameters like fiber orientation, area fraction and fractal dimension. The maximal brilliance presented by the fibers was evaluated using intensity histogram measurements. These quantitative parameters were compared among three different regions of interest along the length of the interdental gingiva using one-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's or Tamhane's T2 post hoc tests. There was an increase ($p < 0.05$) in area fraction and fractal dimension parameters in the central region compared to regions near the teeth, and no difference in the orientation and maximal brilliance of fibers among the tree regions. Our results quantitative demonstrated a denser arrangement of the fibers in the central region reinforcing the model of an interlacement of the transseptal fibers in that region

Key words: gingival. fourier transform. fractal analysis. picrosirius red. polarized light microscopy. transseptal fiber.

1. Introduction

The gingival transseptal fibers are a component of a network of collagen fiber bundles found in the lamina propria of the gingiva (Schroeder and Listgarten, 1997). It has been identified in many mammalian species such as monkeys (Page et al., 1974; Schacter and Bernick, 1976), dogs (Kusters et al., 1991), rats (Bernick, 1960), and humans (Goldman, 1951). This fibers has been described as a group of collagen fibers located between adjacent teeth that run over the alveolar bone crest, originate from the root cementum of one tooth underneath the base of the junctional epithelium and insert into a corresponding region of the cementum of the adjacent tooth (Nanci, 2007).

A scanning electron microscopy study of longitudinal sections of the transseptal gingival area of dogs observed parallel, well-organized, densely packed collagen fiber bundles interconnected with thin fibers (Redlich et al., 1996). This tissue consists of Type III collagen thin fibers distributed throughout large, dense bundles composed mainly of thicker Type I collagen fibers as detected by ultrastructural immunoperoxidase labeling of attached human gingiva samples (Chavier et al., 1984). Because of their tension strength resistance, Type I collagen fibers allow the transseptal fibers to provide structural support (Montes and Junqueira, 1982). It supports the interdental gingiva, protects the interproximal bone, stabilizes tooth position during use and maintains contacts between adjacent teeth (Goldman, 1951; Hassell, 1993; Thilander, 2000). These fibers has also been implicated in mesial tooth drift (Picton and Moss, 1973) and to the relapse of orthodontically moved teeth (Nanci, 2007).

Histomorphological investigations of the transseptal fibers using light microscopy in sagittally cut sections reported straight orientation of the collagen fibers

sectioned along their full length (Schroeder and Listgarten, 1997;Lindhe et al., 2003;Nanci, 2007). Horizontal transverse histological sectioning also permitted the transseptal fibers to be perceived (Kusters et al., 1991;Hassell, 1993).

Polarization light microscopy has been used to qualitatively and quantitatively investigate collagen related structures from the molecular to histomorphological levels of fiber structure. Aided by this useful microscopy tool, sometimes associated with specific collagen staining methods and/or digital image processing and analysis, many histological or histomorphometrical studies have been conducted in healthy and pathological tissues, identifying, visualizing or measuring different features of collagen: type, fiber content, topographic distribution, fiber orientation, degradation and remodeling processes (Puchtler et al., 1973;Whittaker et al., 1994;Arokoski et al., 1996;Koren et al., 2001;Komatsu et al., 2002;Goldman et al., 2003;Rich and Whittaker, 2005;Borges et al., 2007;Nadkarni et al., 2007;Vidal and Mello, 2008;Vidal Bde and Mello, 2009). Despite differences in methodology and rationale, all of the studies cited above have been based on a fundamental optical property of anisotropic materials, birefringence.

Birefringence is a physical property of materials that refract polarized light into two directions and is observed as a bright image in a dark background in a polarizing microscope with the anisotropic substance placed between two crossed polar filters, the polarizer and the analyzer (Wayne, 2009). It is a characteristic of collagen fibers due to their optical anisotropy (Junqueira and Montes, 1983;Whittaker et al., 1994;Bromage et al., 2003). This anisotropic property is dependent on the section plane, with the strongest expression resulting in maximal birefringence when longitudinally sectioned fibers are obtained (Puchtler et al., 1973;Whittaker et al., 1994). Another factor influencing the birefringence of anisotropic specimens when using linear polarized light is their orientation with the azimuth of polarization, making it necessary to adjust their alignment by means of a rotating stage (Wayne, 2009). In

linear polarizing light microscopy, collagen fiber birefringence is maximal when is aligned at 45° to the direction of light propagation (Whittaker et al., 1994). In addition to the physical considerations, birefringence enhancement of collagen fibers can be obtained using Sirius red-based histochemical techniques (Montes and Junqueira, 1991;Rich and Whittaker, 2005). Picosirius staining combined with polarized light microscopy is a selective collagen detection method used to investigate collagen fibers in histological tissues sections (Junqueira et al., 1979;Borges et al., 2007), and it is more specific than bright-field microscopy using trichromes or hematoxylin and eosin stains, with the latter having no collagen specificity (Whittaker et al., 1994;Rich and Whittaker, 2005).

One study based on bright-field and polarization microscopy investigated the arrangement of the transseptal fibers, especially its attachment sites of beagles' teeth. A qualitative description of the fiber arrangement was based on horizontal histological sections of the interdental regions of three animals, and samples were stained using a trichrome method (Heidenhain's Azan) or hematoxylin and eosin. The transseptal fibers was described as a dense fiber bundle bridging the shortest distance between two adjacent teeth with its ends embedded in their cementum. This arrangement was observed regardless of tooth rotation, meaning that the transseptal fiber formation and insertion sites are dependent on tooth position during development rather than anatomically determined (Kusters et al., 1991).

To our knowledge, only qualitative histomorphological and ultrastructural descriptions of gingival transseptal fibers arrangement are available in the literature, and only one of these was a polarized light-based study. Thus, we carried out an investigation of the rat gingival transseptal fibers using linear polarized light microscopy associated with Picosirius red staining and digital image processing/analysis techniques with the objective of quantitative characterization of the collagen fiber

organization. Our rationale was to perform objective quantification of the arrangement of gingival transseptal fibers to aid future studies in this area.

2. Material and Methods

2.1. Animals

The experimental research protocol of this work was approved by the Ethical Committee on Animal Experimentation (protocol number 011/2006 – CEEA, Juiz de Fora Federal University, Brazil), and experiments were performed in accordance with the rules of the International Council for Laboratory Animal Science (Demers et al., 2006).

Twelve adult 8-month-old male albino Wistar rats weighting 373 ± 10 g (mean \pm s.d.) were supplied by the vivarium of the Center of Reproductive Biology (Juiz de Fora Federal University, MG, Brazil). Rats were born and housed in polypropylene cages with pinewood shavings as bedding, kept on ventilated racks with a controlled light-dark cycle (12 hours each) and temperature (23 ± 2 °C) and received rat chow pellets and water *ad libitum*.

Their maxillae were carefully removed after euthanasia by anesthesia overdose with intraperitoneal injection of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (180 mg/kg).

2.2. Histotechnical and Histochemical Procedures

The removed specimens were fixed in 10% formalin for 48 hours and decalcified with 5% nitric acid solution. The end-point detection of decalcification was determined by placing specimens a fixed distance from an x-ray source aided by a positioning device previously described (de Oliveira et al., 2008), and it was determined to be complete when no calcium was observed in the x-ray images (Skinner, 2003). The

decalcified maxillae were sectioned at the midline, and the hemi-maxillae were washed in tap water, dehydrated in graded concentrations of alcohol, clarified in xylene and embedded in paraffin wax. Serial sections oriented in the sagittal plane between the first and second molars and their interdental space were cut at 5 μm thickness with a rotatory microtome (Micron HM 340E, Waldorf, Germany), mounted on slides and stained with 0.1% Sirius red (Directed Red 80, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in saturated picric acid aqueous solution (Junqueira et al., 1979).

2.3. Polarized Light Microscopy and Digital Image Capture

The regions of interest (ROI) were evaluated in the stained sections by linear polarized light microscopy using an optical microscope (AxioPhot I, Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with two linear polarized filters (polarizer and analyzer), 10X and 40X objectives, a halogen lamp, a rotatory stage and a mounted digital camera (AxioCam ICc3, Carl Zeiss, Göttingen, Germany). The images were captured using AxioVision software (AxioVs40 v4.7.2.0, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) in RGB color (24 bit: 8 bits/channel) with the same exposure conditions and saved as non-compressed TIFF files. However, only the red and green channels of the RGB images were used for further processing. The blue channel was discarded as it produced only very low intensity background signals and noise.

We used the micrometer unit of length in our measurements, and pixel size was scaled using a stage micrometer slide image (Carl Zeiss, Jena, Germany) and adjusting the software scaling settings to match the known micrometer scale. The calculated X and Y scaling factors were 0.09 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ for the 40X objective and 0.34 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ for the 10X objective, respectively.

The microscope was carefully set for Köehler illumination. With a fixed-position analyzer, the polarizer was rotated until the darkest background was observed (crossed-polarizer position). The full length of the transseptal fibers was first observed

using the 10X objective, adjusting the rotating stage to obtain maximal brilliance corresponding to a minimal exposure time observed in the software capture panel with the “Auto Live” option marked. After switching to the 40X objective and applying a fixed exposure preset, three ROIs of 512 x 512 pixels (46.08 μm x 46.08 μm) each were captured along the transseptal fiber bundles of the interdental gingival area in the following regions (Fig. 1a): (1) near the cementum of the first molar (Mesial ROI, n=12); (2) in the middle above the alveolar crest (Center ROI, n=12) and (3) near the cementum of the second molar (Distal ROI, n=12). Next to the tooth root cementum, the ROIs were selected to avoid touching the Sharpey’s fibers. Only representative portions of the fibers were captured; large vessels or artifacts were skipped.

2.4. Histomorphometrical approach

Histomorphometric parameters of the transseptal fiber arrangement were measured using digital image processing and analysis techniques. Processing was performed with ImageJ software (version 1.43b; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.4.1. Fiber Orientation

The transseptal fibers orientations were measured using the two-dimensional Fast Fourier Transform (FFT) method (Ayres et al., 2008). First the images (Fig. 2a) were converted to gray-scale and multiplied by a Hanning window (Burger and Burge, 2008) to reduce spectral leakage when calculating the FFT images (Chaudhuri et al., 1987). An FFT of the windowed images was performed, and its power spectrum (PS) was obtained. An oval profile plot was calculated by centering a circular ROI (radius: 128 pixels) onto a PS image (Fig. 2b) and adding up the pixel intensity along each radius spanning from 0° to 180° with 1° increments (Ayres et al., 2007). The pixel

intensity data was normalized to a baseline value of 0 and the principal axis of fiber orientation was measured from the peak position of the oval plot (Fig. 2c).

2.4.2. Fiber content

The separation of the fiber content from the background was accomplished using image segmentation. The rationale of the method applied here was based on the assumption that the transseptal fibers run preferentially in a straight orientation. We used a Directional Fast Fourier Transform filtering method to directionally filter the fibers (Chaudhuri et al., 1987). To reject the image components lying outside the defined angle band (background) and pass-band the bulk of the transseptal fibers images (foreground), a sector window function (1) with a generous 90° bandwidth centered on the principal orientation axis of the fibers was computed as follows:

$$f(\alpha) = \begin{cases} \cos^{1/2}(2(\alpha - \alpha_0)) & , \alpha_0 - \frac{\pi}{4} < \alpha < \alpha_0 + \frac{\pi}{4} \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (1)$$

where,

α_0 = the principal orientation axis of the fibers as previously calculated by the oval plot FFT method (2.4.1);

The captured image was split into green and red channel grayscale images (Fig. 3a, b and c, respectively). FFTs of both channels were calculated, and their power spectra (Fig. 3d) were multiplied by a sector window with 512 X 512 pixel width generated by (1). Filtered images were then obtained from calculation of the inverse FFT of the windowed power spectra (Fig. 3e). Finally, to determine the fiber area from the resultant images, images were thresholded (Otsu, 1979), and binarized, and the separate red and green channel images (Fig. 3f, g) were combined (by addition) to form a single depicted binary mask of the fibers (Fig. 3h).

After the segmentation process, the fiber content was calculated as the percentage of the area of the foreground covered by the binary mask. This quantitative measurement gives the total fiber content in each region; however, no information about the fiber mass arrangement can be inferred from it.

2.4.3. Fractal Dimensional

The fractal dimension is a measurement that characterizes the space-filling of an object and is related to its structural complexity (Dougherty, 2009). There are many kinds of fractal dimension analysis with distinct applications and methods for measurement (Cross, 1994). The Box-counting dimension can be used to analyze the spread or irregularity of a set (Falconer, 2003); thus, it was used here to characterize the fiber arrangement complexity. We calculated the fractal dimension in each ROI by the Box-counting method (Landini, 1996).

The Box-counting dimension (D_B) was calculated on the two-dimensional segmented binary images of the fibers, superimposing a grid of boxes of size ϵ and counting the number of boxes containing at least one pixel of a fiber image ($N(\epsilon)$). This counting process was performed changing the box size from $0.09 \mu\text{m}$ (1 pixel) to $46.08 \mu\text{m}$ (512 pixels). The D_B value was obtained, as shown in Figure 4, from the negative slope of the linear regression of $\log(N(\epsilon))$ against $\log(\epsilon)$ in the range where the slope of the plot was linear (Tambasco et al., 2009).

2.4.4. Maximal Fiber brilliance intensity:

We compared fiber brilliance intensity in the three different ROIs by analyzing the intensity histograms. In each captured image, the gray-level intensity histograms were measured using the segmented mask images to limit the histogram measurement area (Fig. 3h). In this manner, only the foreground segmented principal fibers were

measured (Fig. 3i). The intensity histogram was calculated in each image as the mean of the red and green channel gray-levels. We calculated the following first-order measures from the fiber histograms: Mean Gray Level, Standard Deviation of Gray Levels, and Entropy (Wu et al., 2008).

2.4.5. Statistical analysis

The quantitative data were presented as the mean and standard deviation and were previously examined for normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov test. One-way analysis of variance (ANOVA) was applied to compare the histomorphometric and histogram parameters among the three different groups of ROIs. Once mean differences were determined, post hoc multiple comparison tests were chosen according to the homogeneity of variances verified by Levene's test. We applied Bonferroni's and Tamhane's T2 tests for equal and unequal variances, respectively. Scatter plots were used to determine potential correlations among the histomorphometric measurements. Pearson's correlation coefficient was computed for that demonstrated a linear relationship. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results and Discussion

In this study, gingival transseptal fibers were stained with Picrosirius red and evaluated by linear polarized light microscopy, revealing a birefringent group of collagen fibers ranging over the interproximal alveolar bone crest from the cementum of the first molar distal root to the cementum of the second molar mesial root (Fig. 1a). This qualitative histomorphological description is in agreement with other work (Schroeder and Listgarten, 1997;Lindhe et al., 2003;Nanci, 2007).

The anisotropy of collagen fibers is stronger when they are cut longitudinally (Puchtler et al., 1973). The birefringence of an anisotropic material depends on the orientation of its optical axis with respect to the polarization axis, reaching a maximum at a 45° orientation and a minimum in a position parallel to the polarizing axis (Wayne, 2009). In our sagittally cut samples, fibers were imaged at maximal brilliance over the full length of the transseptal region by rotation of the microscope stage, digital images were captured, and histomorphometrical parameters and brightness intensity histograms were measured along three regions (Fig. 1a). Fiber orientation and intensity histogram measurements from the three ROIs revealed no statistical differences (Table 1). When the stage was rotated an additional 45°, nearly full extinction was observed (Fig. 1b). These results associated with the birefringent behavior allowed us to infer that the majority of the transseptal fibers are in an anisotropic spatial orientation. This confirms previous qualitative findings of a straight-oriented course of the fibers.

Using the 40X objective with a 0.75 numerical aperture (NA), we observed brilliant red- or yellow-colored thicker bundles of fibers and thinner green fibers within a dark background (Fig. 3a). The thick red and yellow fibers are collagen type I fibers, and the thin greenish fibers are collagen Type III (Junqueira and Montes, 1983). The fibers were observed to be embedded in the cementum region near the roots of both teeth. These embedded fiber portions are known as Sharpey's fibers (Nanci, 2007).

We also observed unresolved images beyond the fibers. In optical microscopy, the thin type III collagen fibers have been observed to be 0.5 to 2 μm thick, and the thicker type I fibers are from 2 to 10 μm in thickness (Montes and Junqueira, 1982). The optical resolution of the microscope may be calculated by the Abbe Distance: $d = \lambda / (2NA)$, where λ = light wavelength and NA = Numerical Aperture of the objective (Wayne, 2009). In our system, for the green wavelength of 550 nm the optical resolution was $d = 0.37 \mu\text{m}$, and for the 650 nm red wavelength, $d = 0.43 \mu\text{m}$. As the specimens were sectioned with a 5 μm thickness, within the same slide we could

obtain fibers in several planes with many depths of sectioning, and those unresolved images could be associated with sub-resolution background images (green fibers thinner than $0.37\ \mu\text{m}$) or out of focus deep thinner sectioned fibers.

The amount of fiber in each ROI was evaluated quantitatively by the fiber content area fraction method. The central region presents a larger quantity of fibers than the regions near the teeth with statistical significance as shown in Table 1.

The fiber fractal dimension was evaluated by the Box-counting dimension. The mean Box-counting dimension of the fiber in each ROI is shown in Table 1, and a statistically significant increase in the Box-counting dimension of the central area was observed compared to the mesial and distal areas.

The linear region of the slope of the $\log(N(\epsilon))$ vs. $\log(\epsilon)$ plot used to calculate the Box-counting dimension was visually evaluated in each linear regression plot, and its limits were between $0.54\ \mu\text{m}$ and $4.32\ \mu\text{m}$ (Fig. 4). The linear range of the plot is related to the physical limits of the structures evaluated (Tambasco et al., 2009). In this case, the observed range of linearity was probably due to the size of collagen fiber image widths, and it was insufficient to characterize the analyzed structures as a fractal (Avnir et al., 1998). A scatter plot of the area fraction and the Box-counting dimension values and the Pearson's correlation coefficient calculated from the plot ($r = 0.837$, significant at 0.01) showed a linear relationship between these two variables (Fig. 5). Therefore, the Box-counting dimension calculated in this study was more related to the amount of fiber than to a fractal behavior of the evaluated structures.

This study confirms the straight path of the transseptal fibers, but it also identified an increase in fiber content in the central region compared to regions near the teeth as indicated by the Area Fraction and Box-counting dimension parameters. Our findings are consistent with the model that the transseptal fibers are not continuous over its full length but an interlacement in the central region of fibers originating from the mesial and distal counterparts (Bernick, 1960; Schacter and Bernick, 1976).

Acknowledgments

The support from FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), Rede Mineira de Bioterismo and Rede Mineira de Farmacologia e Toxicologia is gratefully acknowledged.

We would like to thank Marcella Martins Terra for the valuable histotechnical assistance.

References

- Arokoski, J. P., Hyttinen, M. M., Lapveteläinen, T., Takacs, P., Kosztaczky, B., Modis, L., Kovanen, V., Helminen, H., 1996. Decreased birefringence of the superficial zone collagen network in the canine knee (stifle) articular cartilage after long distance running training, detected by quantitative polarised light microscopy. *Ann. Rheum. Dis.*, 55, 253-264.
- Avnir, D., Biham, O., Lidar, D., Malcai, O., 1998. Is the Geometry of Nature Fractal? *Science*, 279, 39-40.
- Ayres, C. E., Bowlin, G. L., Pizinger, R., Taylor, L. T., Keen, C. A., Simpson, D. G., 2007. Incremental changes in anisotropy induce incremental changes in the material properties of electrospun scaffolds. *Acta Biomater.*, 3, 651-661.
- Ayres, C. E., Jha, B. S., Meredith, H., Bowman, J. R., Bowlin, G. L., Henderson, S. C., Simpson, D. G., 2008. Measuring fiber alignment in electrospun scaffolds: a user's guide to the 2D fast Fourier transform approach. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 19, 603-621.
- Bernick, S., 1960. The organization of the periodontal membrane fibres of the developing molars of rats. *Arch. Oral Biol.*, 2, 57-63.
- Borges, L. F., Gutierrez, P. S., Marana, H. R., Taboga, S. R., 2007. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. *Micron*, 38, 580-583.
- Bromage, T. G., Goldman, H. M., McFarlin, S. C., Warshaw, J., Boyde, A., Riggs, C. M., 2003. Circularly polarized light standards for investigations of collagen fiber orientation in bone. *Anat. Rec. B New Anat.*, 274, 157-168.
- Burger, W., Burge, M., 2008. Digital image processing : an algorithmic introduction using Java, 1st ed. Springer, New York.
- Chaudhuri, S., Nguyen, H., Rangayyan, R. M., Walsh, S., Frank, C. B., 1987. A Fourier domain directional filtering method for analysis of collagen alignment in ligaments. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 34, 509-518.

- Chavrier, C., Couble, M. L., Magloire, H., Grimaud, J. A., 1984. Connective tissue organization of healthy human gingiva. Ultrastructural localization of collagen types I-III-IV. *J. Periodontal Res.*, 19, 221-229.
- Cross, S. S., 1994. The application of fractal geometric analysis to microscopic images. *Micron*, 25, 101-113.
- de Oliveira, R. S., de Oliveira Guerra, M., Peters, V. M., Vitral, R. W., 2008. A reliable positioning device for dorsoventral cephalometric radiography of the rat. *Lab Anim. (NY)*, 37, 127-131.
- Demers, G., Griffin, G., De Vroey, G., Haywood, J. R., Zurlo, J., Bedard, M., 2006. Animal research. Harmonization of animal care and use guidance. *Science*, 312, 700-701.
- Dougherty, G., 2009. Digital image processing for medical applications. Cambridge University Press, New York.
- Falconer, K. J., 2003. Fractal geometry : mathematical foundations and applications, 2nd ed. Wiley, Chichester.
- Goldman, H. M., 1951. The topography and role of the gingival fibers. *J. Dent. Res.*, 30, 331-336.
- Goldman, H. M., Bromage, T. G., Thomas, C. D., Clement, J. G., 2003. Preferred collagen fiber orientation in the human mid-shaft femur. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.*, 272, 434-445.
- Hassell, T. M., 1993. Tissues and cells of the periodontium. *Periodontol.* 2000, 3, 9-38.
- Junqueira, L. C., Bignolas, G., Brentani, R. R., 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.*, 11, 447-455.
- Junqueira, L. C., Montes, G. S., 1983. Biology of collagen-proteoglycan interaction. *Arch. Histol. Jpn.*, 46, 589-629.
- Junqueira, L. C., Montes, G. S., Sanchez, E. M., 1982. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry*, 74, 153-156.
- Komatsu, K., Mosekilde, L., Viidik, A., Chiba, M., 2002. Polarized light microscopic analyses of collagen fibers in the rat incisor periodontal ligament in relation to areas, regions, and ages. *Anat. Rec.*, 268, 381-387.
- Koren, R., Yaniv, E., Kristt, D., Shvero, J., Veltman, V., Grushko, I., Feinmesser, R., Sulkes, J., Gal, R., 2001. Capsular collagen staining of follicular thyroid neoplasms by picrosirius red: role in differential diagnosis. *Acta Histochem.*, 103, 151-157.
- Kusters, S. T., Kuijpers-Jagtman, A. M., Maltha, J. C., 1991. An experimental study in dogs of transseptal fiber arrangement between teeth which have emerged in rotated or non-rotated positions. *J. Dent. Res.*, 70, 192-197.
- Landini, G., 1996. Applications of fractal geometry in pathology, in: Lannaccone, P. M., Khokha, M. K. *Fractal Geometry in Biological Systems: An Analytical Approach* (Eds.). CRC-Press, Boca Raton, pp. 205-346.
- Lindhe, J., Karring, T., Lang, N. P., 2003. Clinical periodontology and implant dentistry, fourth ed. Blackwell, Oxford.
- Montes, G. S., Junqueira, L. C., 1982. Biology of collagen. *Rev. Can. Biol. Exp.*, 41, 143-156.

- Montes, G. S., Junqueira, L. C., 1991. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 86 Suppl 3, 1-11.
- Nadkarni, S. K., Pierce, M. C., Park, B. H., de Boer, J. F., Whittaker, P., Bouma, B. E., Bressner, J. E., Halpern, E., Houser, S. L., Tearney, G. J., 2007. Measurement of Collagen and Smooth Muscle Cell Content in Atherosclerotic Plaques Using Polarization-Sensitive Optical Coherence Tomography. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 49, 1474-1481.
- Nanci, A., 2007. *Ten Cate's oral histology : development, structure, and function*, seventh ed. Mosby, Inc., St. Louis.
- Otsu, N., 1979. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Trans. Syst. Man. Cybern.*, 9, 62-66.
- Page, R. C., Ammons, W. F., Schectman, L. R., Dillingham, L. A., 1974. Collagen fibre bundles of the normal marginal gingiva in the marmoset. *Arch. Oral Biol.*, 19, 1039-1043.
- Picton, D. C., Moss, J. P., 1973. The part played by the trans-septal fibre system in experimental approximal drift of the cheek teeth of monkeys (*Macaca irus*). *Arch. Oral Biol.*, 18, 669-680.
- Puchtler, H., Waldrop, F. S., Valentine, L. S., 1973. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beitr. Pathol.*, 150, 174-187.
- Redlich, M., Rahamim, E., Gaft, A., Shoshan, S., 1996. The response of supraalveolar gingival collagen to orthodontic rotation movement in dogs. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, 110, 247-255.
- Rich, L., Whittaker, P., 2005. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz. J. Morphol. Sci.*, 22, 97-104.
- Schacter, R. I., Bernick, S., 1976. The development and maturation of the supracrestal fibers in nonhuman primates. *Angle Orthod.*, 46, 351-360.
- Schroeder, H. E., Listgarten, M. A., 1997. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol.* 2000, 13, 91-120.
- Skinner, R. A., 2003. Decalcification of Bone Tissue, in: An, Y. H., Martin, K. L. (Eds.), *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. Humana Press, Totowa.
- Tambasco, M., Costello, B. M., Kouznetsov, A., Yau, A., Magliocco, A. M., 2009. Quantifying the architectural complexity of microscopic images of histology specimens. *Micron*, 40, 486-494.
- Thilander, B., 2000. Biological basis for orthodontic relapse. *Semin. Orthod.*, 6, 195-205.
- Vidal, B. D., Mello, M. L., 2008. Optical anisotropy of collagen fibers of rat calcaneal tendons: An approach to spatially resolved supramolecular organization. *Acta Histochem.* In Press, Corrected Proof.
- Vidal Bde, C., Mello, M. L., 2009. Structural organization of collagen fibers in chordae tendineae as assessed by optical anisotropic properties and Fast Fourier transform. *J. Struct. Biol.*, 167, 166-175.
- Wayne, R. O., 2009. *Light and video microscopy*. Academic Press/Elsevier, Amsterdam ; Boston.

- Whittaker, P., Kloner, R. A., Boughner, D. R., Pickering, J. G., 1994. Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res. Cardiol.*, 89, 397-410.
- Wu, Q., Merchant, F. A., Castleman, K. R., 2008. *Microscope image processing*. Elsevier/Academic Press, San Diego.

Figure Captions

Fig. 1. Sagittally cut histological section of the interdental region of the first and second maxillary rat molars observed under crossed polarizer and analyzer position using a 10X objective. (a) The full length of the transseptal ligament at maximal brilliance observed over the alveolar bone crest (AC). (b) The same field of (Fig.1a) observed with a 45° rotated stage. The full ligament image is nearly extinguished. M1 and M2 are the cementum sites of the first molar distal root and second molar mesial root respectively. The boxes numbered from 1 to 3 represent the mesial, central and distal ROIs respectively. (*) Alveolar crest fiber group of the periodontium.

Fig. 2. Fast Fourier Transform method used to measure the fiber principal axis of orientation. (a) Gray-scale image of an ROI captured using the 40X objective (46.08 μm x 46.08 μm). (b) FFT power spectrum of the image (Fig. 2a). The 128 pixel radius ROI is centered and the oval plot is calculated spanning from 0° to 180° clockwise. (c) The principal axis of orientation was measured from the peak position.

Fig. 3. Directional Fast Fourier Transform segmentation process. (a) RGB image of an ROI captured using the 40X objective (46.08 μm x 46.08 μm). (b) Its green channel gray-intensity image. (c) The red channel gray-intensity image. (d) Power spectrum of the red channel image. (e) The result of the multiplication of the power spectrum by the sector window function (1). (f) The resultant thresholded red channel image. (g) The resultant thresholded green channel image. (h) The final mask resultant of red and green thresholded images addition. (i) The segmented principal fibers. The segmentation is performed applying the mask (Fig. 3h) to the RGB image (Fig. 3a).

Fig. 4. Representative $\log [N(\epsilon)] - \log(\epsilon)$ plot used to obtain the Box-counting dimension. The Box-counting dimension was calculated from the linear range of the plot placed between the dashed vertical lines. (ϵ , box size computed in pixel unit)

Fig. 5. Scatter plot of the Area fraction and Box-counting dimension parameters. These parameters demonstrated a linear relationship. The Pearson's correlation coefficient ($r = 0.837$) shows a strong positive correlation.

Table 1
 Histomorphometric and Histogram parameters of three different regions of the transeptal fibers

	ROI (2123.37 μm^2)		
	MESIAL	CENTRAL	DISTAL
Fibre Orientation (Degree)	91.67 \pm 5.57	93.67 \pm 5.55	96.08 \pm 4.89
Area Fraction (%)	42.66 \pm 4.99 ^a	48.51 \pm 4.44	42.76 \pm 4.24 ^a
D _B	1.78 \pm 0.04 ^b	1.82 \pm 0.02	1.80 \pm 0.03 ^b
MGL	96.85 \pm 11.22	98.71 \pm 11.19	98.19 \pm 10.08
SDGL	32.39 \pm 3.60	29.51 \pm 3.18	32.59 \pm 2.55

The results are expressed in mean \pm standard deviation ;

ROI = Region of Interest; D_B = Box-counting dimension; MGL = Mean Gray Level; SDG = Standard Deviation of Gray Levels;

^a Bonferroni's Test, ^b Tamhane's T2 Test, p < 0.05: significantly less than central region.

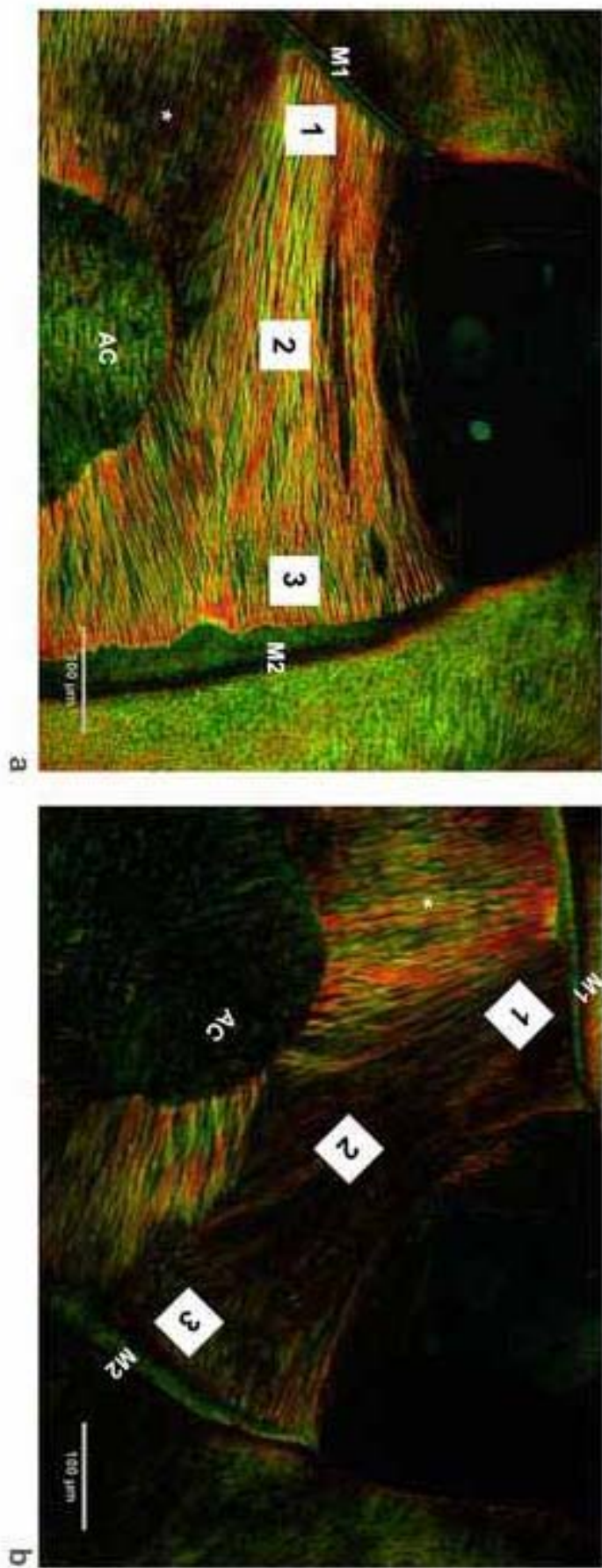


Figure 1

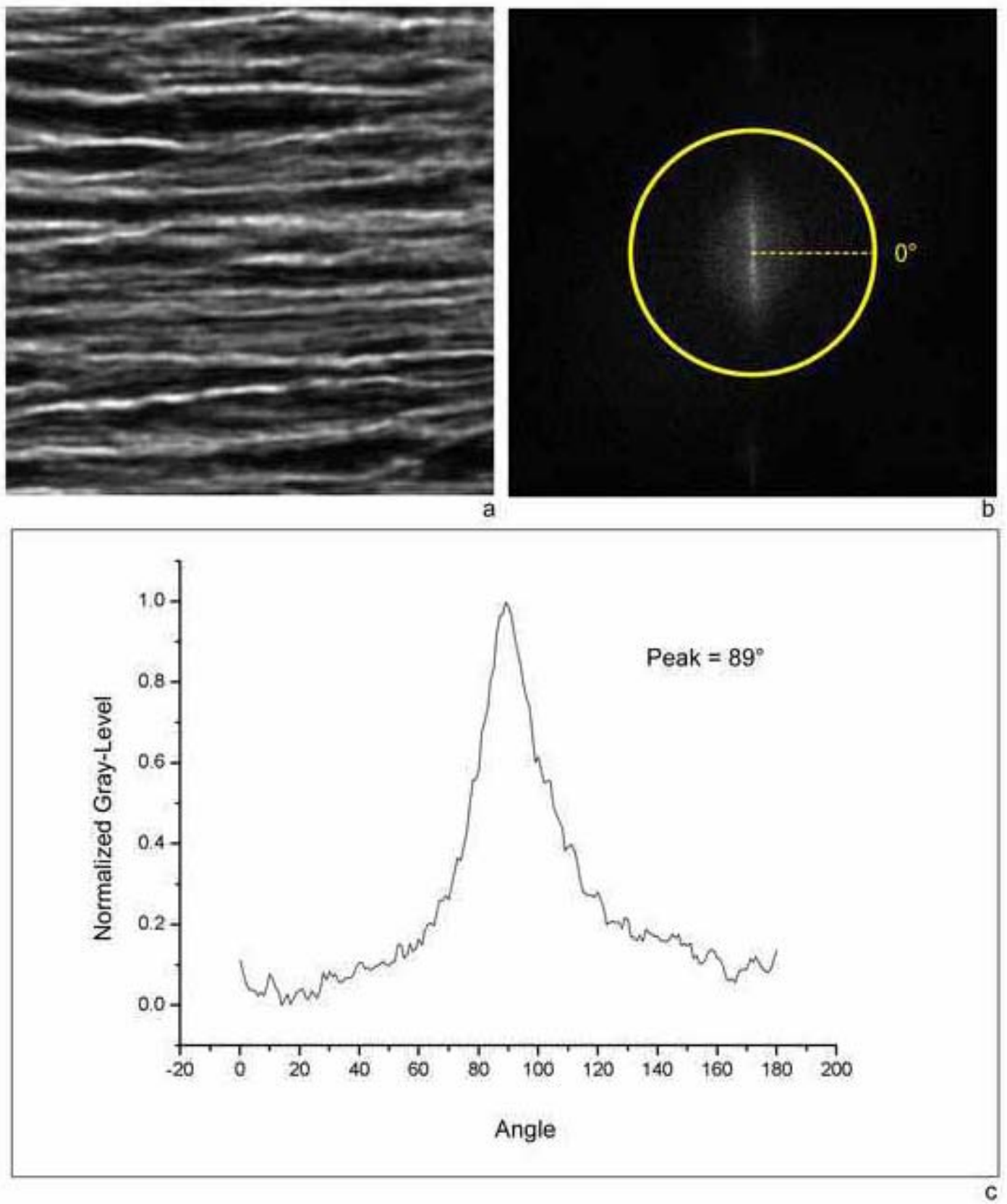


Figure 2

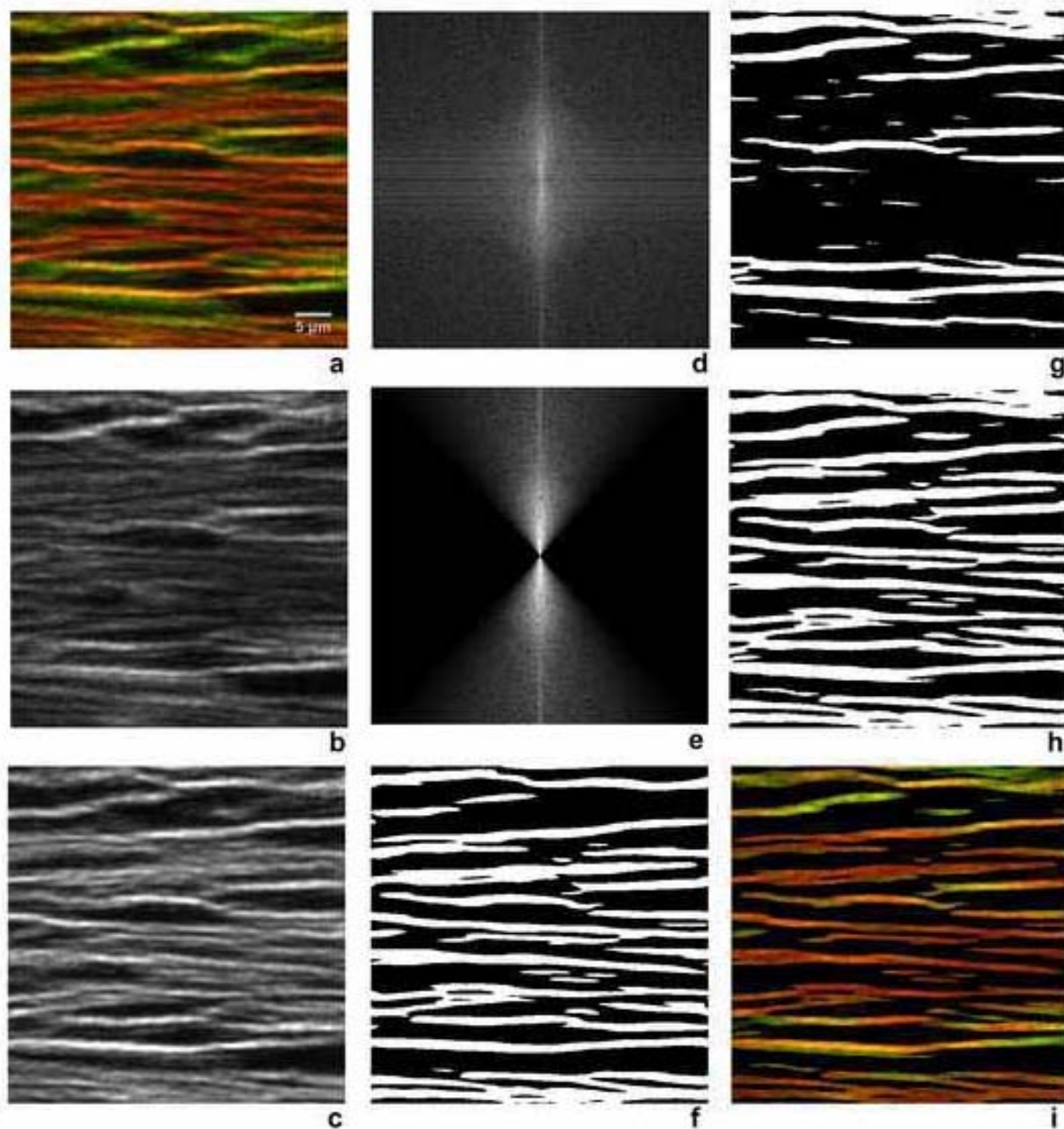


Figure 3

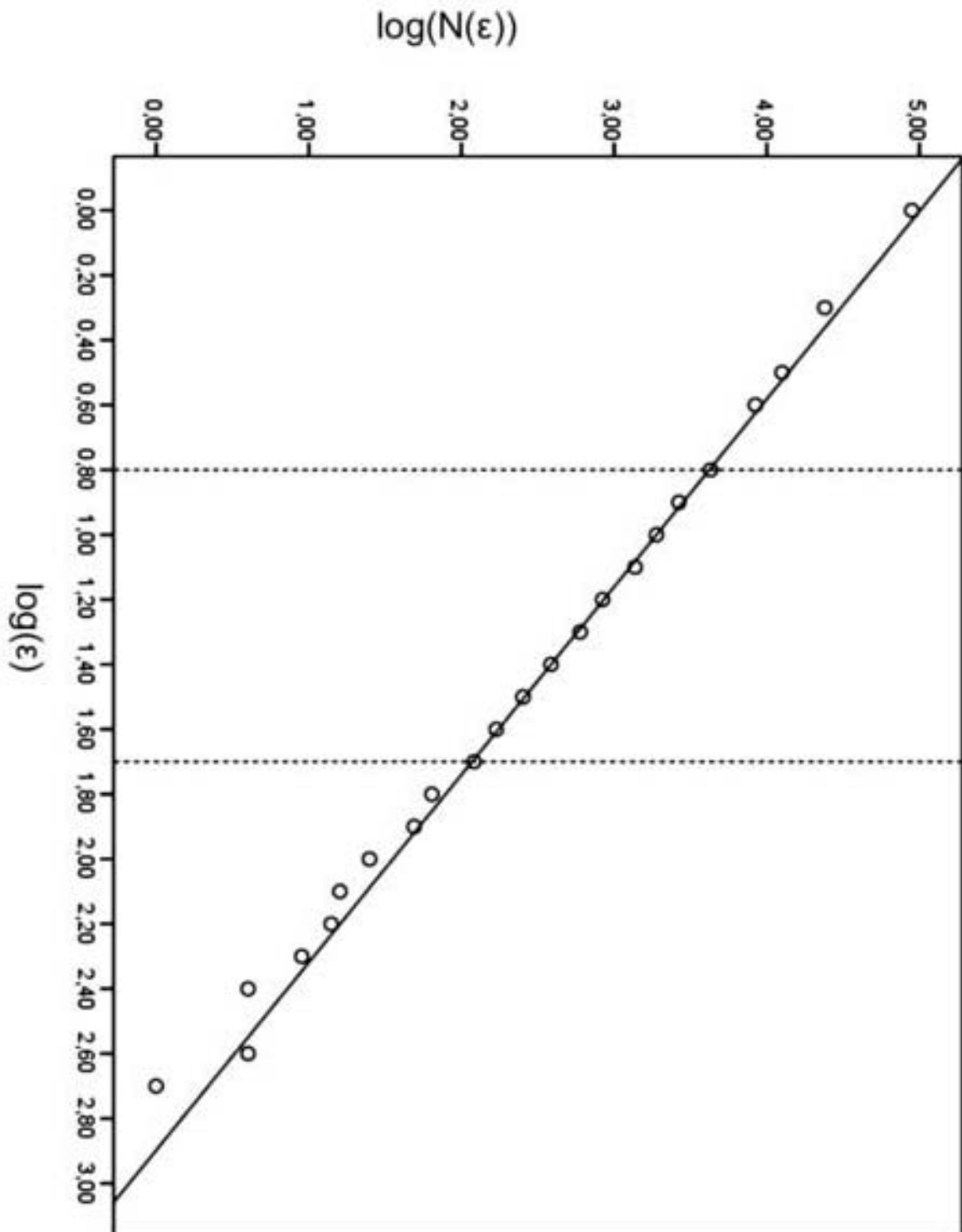


Figure 4

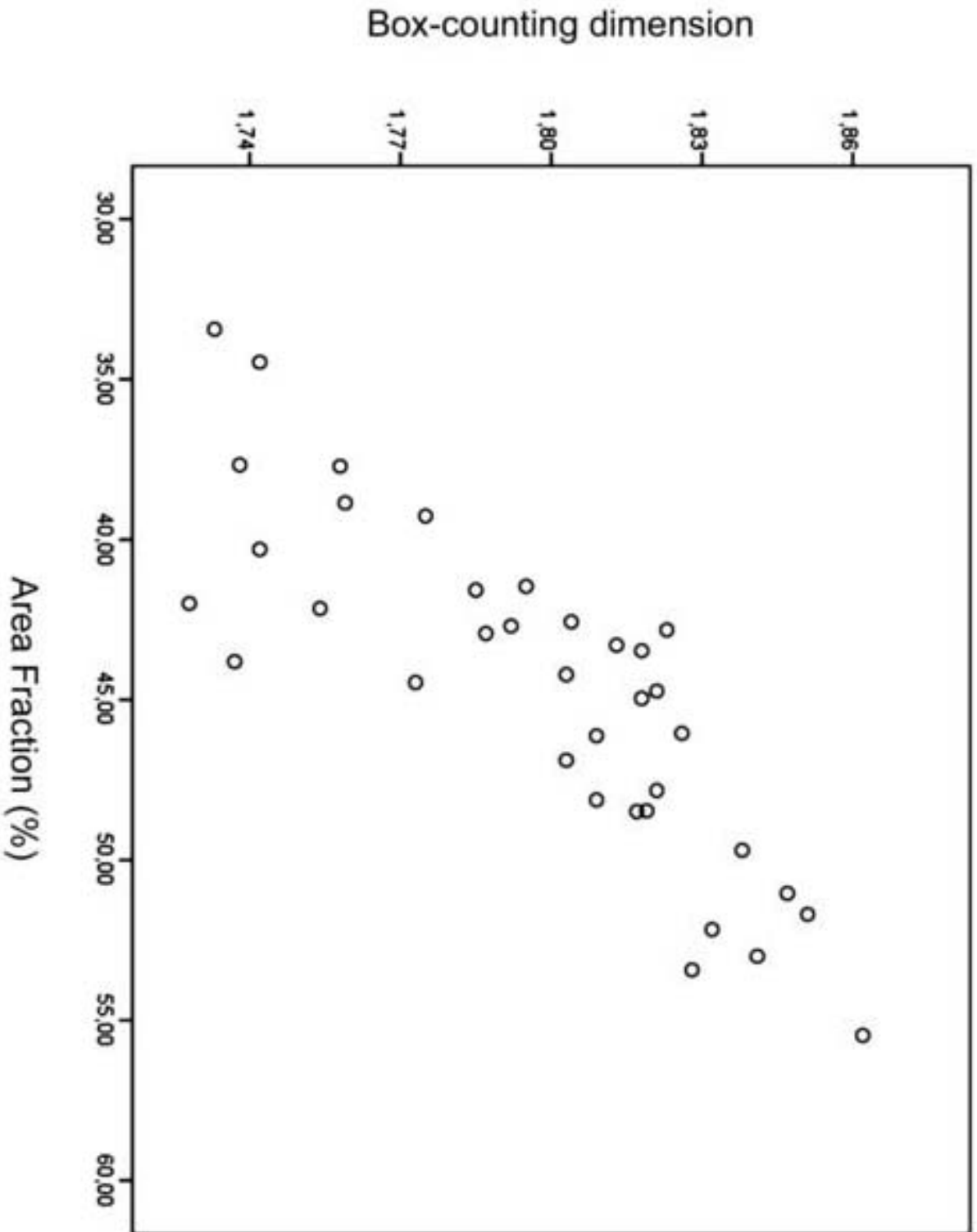


Figure 5

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)