

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Centro de Ciências da Saúde

Faculdade de Odontologia

**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES PULPARES APÓS EXPANSÃO
RÁPIDA DA MAXILA EM RATOS**

KELLY GALISTEU LUIZ

CD

Dissertação submetida ao corpo docente da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos, para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia (Ortodontia).

Rio de Janeiro

2018

ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES PULPARES APÓS EXPANSÃO RÁPIDA DA MAXILA EM RATOS

KELLY GALISTEU LUIZ, CD

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tirre de Souza Araújo

Dissertação submetida ao corpo docente da Faculdade de Odontologia da Universidade do Brasil - UFRJ, como parte dos requisitos, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia (Ortodontia).

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Maria Bernadete S. Stuani

Profa. Dra. Margareth M. G. de Souza

Profa. Dra. Matilde da C. Gonçalves Nojima

Rio de Janeiro

2018

Ficha Catalográfica

GALISTEU LUIZ, K.

Análise das alterações pulpares após expansão rápida da maxila em ratos. Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Odontologia, 2018.

68f.

**Dissertação: Mestrado em Odontologia (Ortodontia) –
Universidade do Brasil – UFRJ, Faculdade de Odontologia, 2018.**

1. Polpa dentária

2. Expressão gênica

3. Técnica de expansão palatina

4. Teses

I. Título

II. Dissertação (Mestrado - UFRJ/Faculdade de Odontologia)

Linha de Pesquisa: Fisiomorfologia, terapêutica e bioengenharia de tecidos bucais.

Projeto: Análise das alterações pulpares após expansão rápida da maxila em ratos.

Comitê de Ética: Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), Protocolo nº 2013.1.970.58.6 de 29/04/2015, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP), Universidade de São Paulo (USP).

DEDICO

À minha família, em especial aos meus pais, **Jorge Elias Luiz e Norma Sueli Galisteu Luiz**, e ao meu memorável avô, **Antônio Luiz**, pelo imensurável amor, apoio e incentivo para a realização de mais uma grande etapa. Meus sinceros agradecimentos por nunca medirem esforços à mim e sempre prezarem pela minha felicidade. Guardarei, eternamente, seus ensinamentos como meu bem mais rico e precioso.

AGRADECIMENTOS

Aos familiares que acompanharam minha caminhada, tios (as) e primos (as), pela motivação em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora e coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração Ortodontia, **Dra. Mônica Tirre de Souza Araújo**, por toda dedicação e empenho neste Programa. Pelo aprendizado e confiança, permitindo o desenvolvimento deste projeto. Pelo coração grandioso, zelando sempre pelo melhor aos seus alunos e pacientes. Pela agradável convivência nesses anos e todo carinho dispensado à mim.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ortodontia da UFRJ, **Dra. Ana Maria Bolognese, Dr. Antônio Carlos de Oliveira Ruellas, Dr. Eduardo Franzotti Sant'Anna, Dr. José Fernando Stangler Brazalle, Dr. José Vinícius Bolognesi Maciel, Dr. Lincoln Issamu Nojima, Dra. Liliane Siqueira de Moraes, Dra. Luciana Rougemont Squeff, Dra. Margareth Maria Gomes de Souza e Dra. Matilde da Cunha Gonçalves Nojima**, por compartilharem seus conhecimentos com tamanha dedicação e amor, pela busca incansável pelo novo, pelos conselhos e por contribuírem veemente para minha formação pessoal e profissional.

Às admiráveis professoras **Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani** e **Dra. Mirian Aiko Nakame Matsumoto**, por me instigarem à Ortodontia e à pesquisa desde a graduação, conduzindo minha formação de maneira humana e criteriosa.

Por exercerem com amor e dedicação a arte de ensinar, me inspirando a seguir os seus passos.

À minha 51ª turma de Mestrado em Ortodontia da FO-UFRJ, **Anna Paula Nigri, Bárbara Pilla Tavares, Larine Ferreira Lira, Mariana Lago de Salles Brasil e Mirella Lemos de Queiróz Tavares**, pelos ensinamentos e os momentos inesquecíveis, tornando meus dias divertidos e proveitosos. Em especial à amiga do coração, **Bárbara Tavares!** Não poderia deixar de exprimir minha euforia e gratidão por tê-la nesses 2 anos de intensa convivência e aprendizado! Obrigada pelo companheirismo nas madrugadas de estudo, nos momentos de angústia e de extrema felicidade, e por tudo que fez por mim! Levarei comigo, para sempre, os valiosos registros de nossa amizade, carinho e alegria!

Aos colegas da 50ª turma de Mestrado em Ortodontia da FO-UFRJ, **Adilson Tolfo de Oliveira, Carolina Ribeiro Starling, Laura Mello Figueiredo, Patrícia Valim, Priscilla de Almeida Solon de Mello e Ramiro Estacia da Silveira**, pela receptividade, apoio e ensinamentos.

Aos colegas da 52ª turma de Mestrado em Ortodontia da FO-UFRJ, **Alyson de Souza Reis, Flávio Mendonça Copello, Katherine J. de C. M. Prezado Silver, Natan Oliveira Guss, Sylvia de Araújo Paes Souza, Ursula Tavares Puetter**, pela amizade e bons momentos de descontração. Agradeço, em especial, à **Katherine Silver**, pelo carinho, ótima companhia, convivência harmoniosa em casa e na Universidade, e as divertidas e afáveis lembranças.

Aos colegas doutorandos em Ortodontia da FO-UFRJ, **Adriele da Silva Araújo, Alice Spitz, Amanda Carneiro da Cunha, Ana Paula Tenório de Sá, Carolina Ribeiro Starling, Daniel Paludo Brunetto, Dayanne Lopes da Silva,**

Fernanda Blaudt Carvalho Marques, Georgia Wain Thi Lau, Hibernon Lopes Filho, Ilana Oliveira, Jamille Barros Ferreira, Johnny de Gawn, Lilian Siqueira de Lima, Lucio Henrique Maia, Pedro Lima Emmerick Oliveira e Rodrigo Lopes Lima, pela ótima convivência, sempre dispostos a ajudar.

Aos adoráveis amigos, **Mila dos Santos Silva e Gabriel dos Santos Silva**, pela calorosa receptividade e acolhimento em minha chegada ao Rio de Janeiro. Não há palavras suficientes para expressar o carinho e as boas lembranças desta etapa na companhia de vocês.

Aos queridos **Dr. Carlos Alberto Estevanell Tavares** e sua esposa **Beatriz Pilla Tavares**, pelo farto apoio e positividade que proporcionaram à mim nesta trajetória. Obrigado por tanto esmero e dedicação.

Aos meus companheiros de laboratório da Universidade de São Paulo (USP), **Gabriel Dessotti Barretto, Larissa Ribeiro Nogueira, Maya Fernanda Manfrin Arnez e Patrícia Maria Monteiro**, por compartilharem muito além de técnicas e experimentos, tornando minhas jornadas animadas.

Aos funcionários do Departamento de Ortodontia da FO-UFRJ, **Diane Esteves de Souza Gomes, Laís Paiva Monteiro, Mônica Mello do Nascimento Gonçalves e Vanilda Antônio Saturnino**, pelo convívio e disponibilidade.

Aos **alunos da Disciplina de Ortodontia da graduação da FO-UFRJ** que tanto contribuíram para minha formação, permitindo uma experiência prazerosa e agradável com a docência nas aulas práticas.

Aos **pacientes do Departamento de Ortodontia**, pela paciência e confiança depositada em meus primeiros passos na Ortodontia.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa de estudos concedida, auxiliando na minha formação

acadêmica e profissional e à **Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

A **todas as pessoas que passaram pela minha vida**, e que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho e para minha formação pessoal e profissional, expresso aqui minha gratidão.

RESUMO

GALISTEU LUIZ, Kelly. **Análise das alterações pulpares após expansão rápida da maxila em ratos**. Orientadora: Dra. Mônica Tirre de Souza Araújo. Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Odontologia, 2018. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Ortodontia). 68f.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da expansão rápida da maxila (ERM) na polpa dentária de dentes de ancoragem de ratos jovens, através das análises histomorfológica, histomorfométrica e de expressão gênica. Oitenta (n=80) ratos *Wistar* machos foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: Grupo Controle (GC, n=40), em que os animais não tiveram ERM e foram sacrificados nos períodos de 3, 7, 14 e 21 dias após o início do experimento; e Grupo Experimental (GE, n=40), cujos animais foram submetidos à ERM e sacrificados nos mesmos períodos do Grupo Controle. As polpas dentárias dos incisivos superiores de 20 animais (n=20) de cada grupo, GC e GE, foram extraídas para a análise da expressão gênica do RNAm, pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR), para os genes Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*Vegf*), Sialofosfoproteína da Dentina (*Dspp*) e Ciclooxigenase-2 (*Cox-2*), e de 20 animais (n=20) para as análises histomorfológica e histomorfométrica do tecido pulpar. Todos os grupos que sofreram ERM apresentaram sinais da

ocorrência de inflamação e aumento da densidade de vasos sanguíneos, com alterações transitórias na camada de odontoblastos. Houve aumento significativo da expressão gênica de *Vegf* em todos os períodos experimentais, sendo para *Cox-2* apenas nos períodos de 3 e 7 dias, e para *Dspp* no 7º e 14º dias. Conclui-se que a ERM induziu a remodelação do tecido pulpar, com modulação transitória das expressões gênicas analisadas e da vascularização.

Palavras-chave: polpa dentária, técnica de expansão palatina, expressão gênica, histologia.

SUMMARY

GALISTEU LUIZ, Kelly. **Analysis of pulpal changes after rapid maxillary expansion in rats**. Orientadora: Dra. Mônica Tirre de Souza Araújo. Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Odontologia. 2018. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Ortodontia). 68f.

The objective of this study was to evaluate the effects of rapid maxillary expansion (RME) on the dental pulp of anchoring teeth of young rats through histomorphological, histomorphometric and gene expression analyzes. Eighty (n= 80) male *Wistar* rats were randomly assigned to 2 groups: Control Group (CG, n=40), in which the animals had no ERM and were sacrificed at 3, 7, 14 and 21 days after initiation of the experiment; and Experimental Group (GE, n=40), whose animals were submitted to RME and sacrificed in the same periods of the GC. The dental pulps of the upper incisors of twenty animals (n=20) from each group, GC and GE, were extracted for analysis of the mRNA gene expression by the Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) technique for the Vascular Endothelial Growth Factor (*Vegf*), Dentin Sialophosphoprotein (*Dspp*) and Cyclooxygenase-2 (*Cox-2*) genes, and twenty animals (n=20) for the histomorphological and histomorphometric analyzes of the pulp tissue. All groups that suffered RME showed signs of inflammation occurrence and increased

blood vessel density, with transient changes in the odontoblast layer. There was a significant increase in *Vegf* gene expression in all experimental periods, being for *Cox-2* only in periods of 3 and 7 days, and for *Dspp* in the 7th and 14th days. It was concluded that ERM induced remodeling of pulp tissue, with transient modulation of the analyzed gene expression and vascularization.

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar / Complementary deoxyribonucleic acid
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animal
CG	Control group
COX-2	Ciclooxigenase 2 (proteína) / Cyclooxygenase-2 (protein)
Cox-2	Ciclooxigenase 2 (gene) / Cyclooxygenase-2 (gene)
C_t	Ciclo limiar
DSPP	Sialofosfoproteína da dentina (proteína) / Dentin sialophosphoprotein (protein)
Dspp	Sialofosfoproteína da dentina (gene) / Dentin sialophosphoprotein (gene)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EG	Experimental group
ERM	Expansão rápida da maxila
g	Gravidade
GAPDH	Gliceraideído-3-fosfato desidrogenase (proteína) / Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (protein)

Gapdh	Gliceraideído-3-fosfato desidrogenase (gene) / Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gene)
GC	Grupo controle
GE	Grupo experimental
MDI	Movimentação dentária induzida
n	Amostral
NCPs	Proteínas não colagenosas
PBS	Tampão fosfato salino
RME	Rapid maxillary expansion
RNA	Ácido ribonucleico / Ribonucleic acid
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro / Messenger ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real / Real time reverse transcription polymerase chain reaction
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (proteína) / Vascular endothelial growth fator (protein)
Vegf	Fator de crescimento endotelial vascular (gene) / Vascular endothelial growth fator (gene)
Vv	Densidade do volume de perfis de vasos sanguíneos / Volumetric density of blood vessel profiles
Σ	Somatório
Δ	Delta

LISTA DE FIGURAS

DELINEAMENTO DA PESQUISA

	Página
Figura 1 Dispositivo ortodôntico utilizado para ERM nos animais (A). Compasso de pontas secas evidenciando o comprimento da mola (B), aferido em 1,5 mm em régua milimetrada (C).....	10
Figura 2 Adaptação e estabilização do dispositivo ortodôntico entre os incisivos após ERM (A) e desgaste em altura dos incisivos inferiores após finalização da montagem do aparelho (B).....	12
Figura 3 Imagens do exame radiográficos ilustrando a sutura palatina mediana antes do procedimento (A), e abertura da mesma após a ERM (B).....	13
Figura 4 Extração da polpa de incisivo superior por acesso apical.....	14
Figura 5 Imagens ilustrativas do escore histológico da intensidade de inflamação no tecido pulpar.....	21
Figura 6 Grade de 96 pontos do <i>software</i> ImageJ utilizada para quantificação dos vasos sanguíneos.....	22

ARTIGO

Página

Figure 1	Photomicrographs from dental pulp tissue of the Control group (A) and Experimental group (B, C, D, E). Odontoblasts layer (a), Weil-free zone of cells (b), cell-rich zone (c), dentin (d), hypertrophied odontoblasts (e), hyperemic and dilated blood vessel (f), dilated blood vessel (g).....	47
Figure 2	Expression of the median, interquartile range, maximum and minimum values of the number of inflammatory cell scores during 21 days ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis, Dunn's test, $**p < 0.01$).....	48
Figure 3	Expression of mRNA during 21 days of experiment. Comparative expression between CG and EG in the experimental periods to <i>Vegf</i> (A), <i>Cox-2</i> (C) e <i>Dspp</i> (E). Comparative expression between experimental periods of CG and EG to <i>Vegf</i> (B), <i>Cox-2</i> (D) e <i>Dspp</i> (F). $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, ns=non-significant.....	49

LISTA DE TABELAS

DELINEAMENTO DA PESQUISA

	Página
Tabela 1 Distribuição da amostra de acordo com o tempo de experimento.....	8
Tabela 2 Escore do grau de inflamação adaptado de Wolfson e Seltzer (1975), e de Holland <i>et al.</i> (2007).....	21

ARTIGO

	Página
Table 1 Number of animals with pulp phenomena microscopically observed in GC and EG (n=5 for each group).....	46
Table 2 Mean and standard deviation of blood vessel density (Vv) for GC and GE periods.....	46

ÍNDICE

		Página
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	PROPOSIÇÃO.....	6
3	DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	7
3.1	AMOSTRA.....	7
3.2	PROCEDIMENTOS ANESTÉSICOS.....	9
3.3	CONFECÇÃO, INSTALAÇÃO E ATIVAÇÃO DO DISPOSITIVO ORTODÔNTICO PARA ERM.....	9
3.4	RADIOGRAFIA DA SUTURA PALATINA MEDIANA.....	12
3.5	ACOMPANHAMENTO CLÍNICO.....	13
3.6	EUTANASIA.....	14
3.7	COLETA DAS AMOSTRAS.....	14
3.7.1	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA RT-PCR.....	14
3.7.2	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA HISTOLOGIA.....	15
3.8	COLORAÇÕES DAS AMOSTRAS PARA HISTOLOGIA.....	17
3.8.1	COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA (HE).....	17
3.8.2	COLORAÇÃO COM TRICÔMICO DE MASSON (TM).....	18
3.9	AQUISIÇÃO DAS IMAGENS HISTOLÓGICAS.....	19

3.10	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	19
3.10.1	ANÁLISE MICROSCÓPICA DO TECIDO CONJUNTIVO PULPAR.....	19
3.10.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA DO TECIDO INFLAMATORIO....	20
3.11	ANÁLISE HISTOMÉTRICA DO TECIDO PULPAR.....	22
3.11.1	QUANTIFICAÇÃO DA DENSIDADE DE VOLUME DE PERFIS DE VASOS SANGUÍNEOS.....	21
3.12	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	23
3.12.1	EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E OBTENÇÃO DO RNA TOTAL	23
3.12.2	SÍNTESE DO cDNA.....	25
3.12.3	RT-PCR.....	25
3.13	PRECISÃO DA METODOLOGIA.....	27
3.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4	DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA	29
4.1	ARTIGO: GALISTEU LUIZ, K.; MONTEIRO, P.M., RIBEIRO, L.N.S.; ISSA, J.P.M., STUANI, M.B.S., ARAUJO, M.T.S. Analysis of pulpal changes after rapid maxillary expansion in rats. Artigo a ser submetido na European Journal of Dentistry (ISSN 1305-7464).....	29
5	DISCUSSÃO.....	50
6	CONCLUSÕES.....	57
7	RECOMENDAÇÕES.....	58
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
9	ANEXOS.....	68
9.1	ANEXO 1: Certificado de Aprovação da CEUA.....	68

1 INTRODUÇÃO

Entre os objetivos da Ortodontia e Ortopedia Facial está a correção de discrepâncias sagital, vertical ou transversal, sejam de natureza esquelética, dentária, ou de ambas. Os procedimentos de expansão rápida da maxila (ERM) são rotineiramente executados na clínica ortodôntica, e inúmeros trabalhos têm mostrado a sua efetividade no tratamento das deficiências esqueléticas transversais (Haas, 1980; Baccetti *et al.*, 2000; Mcnamara *et al.*, 2003).

No intuito de corrigir as maloclusões, os ortodontistas utilizam sistemas de forças artificiais para proporcionar a movimentação dentária induzida (MDI) ou a modificação do crescimento ósseo, através das forças ortodônticas/ortopédicas (Mostafa *et al.*, 1983), evitando a ocorrência de assimetrias, distúrbios funcionais e prejuízos ao crescimento e desenvolvimento crâniomaxilofacial (Zandi *et al.*, 2014; Ong *et al.*, 2015).

Apesar do objetivo principal da ERM ser a abertura da sutura palatina mediana, a mecânica da força desse procedimento é aplicada à coroa dos dentes, e, transmitida ao periodonto de sustentação. Este procedimento induz mudanças teciduais não somente na sutura, mas também nos tecidos periodontais e pulpare dos dentes de ancoragem (Von Böhl *et al.*, 2012).

O tecido pulpar é composto por grande densidade de fibras nervosas e abundantemente irrigado por vasos sanguíneos, provenientes da parede do osso alveolar por meio dos canais de Volkman, que se dispersam pelo periodonto, e

adentram aos forames apical e acessórios dos dentes (Sandstedt, 1904; 1905; Reitan, 1947; 1960; 1967; 1974; Mostafa *et al.*, 1983; Meikle, 2006; Bister e Meikle, 2013).

As forças induzidas experimentalmente produzem alteração do fluxo sanguíneo da polpa devido às reações vasculares (Krishnan e Davidovitch, 2015), mediadas por fatores de crescimento angiogênicos, entre eles, o VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular). A presença deste mitógeno específico de células endoteliais promove aumento da permeabilidade vascular, e é primordial para que ocorra o processo de angiogênese, permitindo o reparo pulpar (Davidovitch, 1991). É detectado em situações de traumatismos dentais (Andreasen, 1988) e em tecidos íntegros, indicando sua importância na manutenção de vasos existentes (Charnock-Jones *et al.*, 2002). Esta citocina está envolvida na ocorrência e progressão do processo inflamatório (Dvorak, Brown, *et al.*, 1995; Dvorak, Detmar, *et al.*, 1995; Dvorak, 2002; Hicklin e Ellis, 2005), sendo altamente regulada, iniciando sobre breves períodos, e inibida no decorrer do tempo (Folkman e Shing, 1992).

A reação inflamatória no tecido pulpar consiste na resposta fisiológica mais precoce diante de traumas ou do estresse mecânico ocasionado pela aplicação de forças ortodônticas, desencadeando a liberação do ácido araquidônico das membranas celulares (Vandevska-Radunovic *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1998; Ohzeki *et al.*, 1999). Este, ao ser catalisado pela enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), converte-o em prostanóides da série 2, a citar as prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (Pairet e Engelhardt, 1996; Ohzeki *et al.*, 1999; Güven *et al.*, 2007). Estes, por sua vez, mediam importantes eventos da resposta inflamatória (Hinz e Brune, 2002), tendo as prostaglandinas papel

crítico na patogênese e no reparo da doença pulpar (Cohen e Schwartz, 1987; Fouad, 2009; Hargreaves e Berman, 2015).

A expressão da enzima COX-2 é induzida na maioria dos tecidos, estando em maiores níveis nos processos inflamatórios agudos ou crônicos (Rouzer e Marnett, 2009), em até 20 vezes mais que sua expressão basal (Pairet e Engelhardt, 1996). Evidências demonstram que a produção de prostanoídes pela COX-2 promove a expressão de VEGF, com subsequente angiogênese (Leahy *et al.*, 2000; Majima *et al.*, 2000; Iñiguez *et al.*, 2003). A inter-relação entre a força exercida pelo fluxo sanguíneo na parede do vaso e a indução da expressão da COX-2 nas células endoteliais subsidiam dados para melhor compreensão da inter-relação entre a intensidade do processo inflamatório e o potencial regenerativo do tecido pulpar (Artese *et al.*, 2002; Güven *et al.*, 2007; Goldberg *et al.*, 2015).

O que faz a polpa dentária uma estrutura particular em seu aspecto estrutural, é o fato de estar envolta por tecido mineralizado rígido, não permitindo distensões (De Deus, 1973). A intensidade das cargas de forças pode provocar injúrias no tecido pulpar, desencadeando uma resposta inflamatória de maior gravidade. Assim, a retenção de exsudato e o acúmulo excessivo de fluído tissular, confinados por paredes inelásticas, pode levar ao colapso vascular parcial ou total, com possibilidade de necrose. Porém, se a resposta inflamatória for moderada, a polpa se recuperará devido às suas excelentes propriedades regenerativas e alta vascularização (Seltzer e Bender, 1984; Bhaskar, 1989).

As forças de grande magnitude, como as aplicadas durante a expansão rápida da maxila podem induzir alterações na vascularização e no metabolismo pulpar, culminando em algum grau de degeneração, ou ainda com a formação de

dentina reacional (Seltzer e Bender, 1984; Piattelli e Trisi, 1993).

A dentina, o tecido mineralizado mais volumoso do dente, circunda e protege o tecido pulpar (Ten Cate, 1992). Ao redor deste estão localizados os odontoblastos, os quais secretam tecido não-mineralizado com matriz rica em colágeno tipo I, denominada de pré-dentina, que após a deposição dos cristais de hidroxiapatita é transformada em dentina (Yamamoto *et al.*, 2015). Este processo de biomineralização envolve interações com proteínas não-colagenosas (NCPs), a citar a sialofosfoproteína da dentina (DSPP), que promove e controla ativamente a mineralização das fibras de colágeno e o crescimento de cristais dentro da pré-dentina de forma centrípeta. Sua importância foi demonstrada em testes *in vitro* sugerindo a regulação da mineralização e maturação da dentina (Suzuki *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2014).

Estudos apontam falhas na regulação neurológica da atividade secretora de matriz dentinária pelos odontoblastos, durante a revascularização e reinervação do processo de reparo pulpar pós-trauma (Andreasen *et al.*, 1987; Andreasen, 1989; 2001). Esta condição pode levar à algum grau de obliteração da câmara pulpar, através da formação de dentina reacional, coronária ou radicular. Da mesma forma, alterações no mecanismo da DSPP podem promover alterações dentinárias com implicações no espaço da câmara pulpar (Suzuki *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2014).

A deposição indiscriminada de mineral sobre o complexo dentina-polpa pode evoluir à condição clínica de calcificação pulpar (Seltzer e Bender, 1984; Piattelli e Trisi, 1993). As consequências se manifestam com a deformação da anatomia interna e redução do espaço da câmara pulpar, alteração de cor da coroa dentária (Patterson e Mitchell, 1965; Amir *et al.*, 2001; McCabe e Dummer,

2012), presença de nódulos pulpare, calcificações difusas e obliterações parciais ou totais, que podem comprometer a vitalidade pulpar (Andreasen, 1970; De Cleen, 2002).

Pelo exposto, este trabalho pretende investigar alterações celulares, vasculares e a expressão gênica que caracterizam as remodelações teciduais importantes que ocorrem no tecido conjuntivo da polpa dentária, submetida à expansão rápida da maxila.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vivo* a influência da expansão rápida da maxila sobre o tecido pulpar de dentes de ancoragem de ratos, após os períodos de 3, 7, 14 e 21 dias, por meio de:

2.1 descrição histológica dos aspectos celulares teciduais;

2.2 quantificação da densidade do volume de perfis de vasos sanguíneos e de células inflamatórias, e,

2.3 quantificação da expressão gênica dos marcadores para vascularização (*Vegf*) e inflamação pulpar (*Cox-2*), assim como mineralização dentinária (*Dspp*).

3 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Este estudo utilizou-se do método experimental *in vivo*. Os procedimentos obedeceram aos princípios éticos e legais especificados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e, este projeto teve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, protocolo nº 2013.1.970.58.6, conforme Anexo 1 (página 68).

3.1 AMOSTRA

Foram utilizados 80 ratos machos albinos, da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus, albinus)* com seis semanas de vida (jovens em desenvolvimento) pesando em média 180 g, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto. A escolha deste animal baseou-se principalmente na disponibilidade, facilidade de manipulação e possibilidade de padronização. Animais machos foram selecionados para eliminar qualquer variabilidade hormonal devido ao ciclo reprodutivo das fêmeas.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, Grupo Controle (GC, n=40) e Grupo Experimental (GE, n=40), subdivididos em quatro subgrupos (n=10), de acordo com o período experimental. A Tabela 1 (página 8) detalha a distribuição dos animais nos diferentes períodos do estudo.

Os animais do GE receberam ERM e foram eutasiados nos períodos de 3, 7, 14 e 21 dias após o procedimento. Os animais do GC não receberam ERM, sendo submetidos apenas ao procedimento anestésico, e eutasiados nos mesmos períodos do GE. O GC foi utilizado para caracterizar o tecido pulpar normal, servindo como parâmetro para comparação com os animais do GE. Cinco animais (n=5) de cada subgrupo foram destinados para análise da expressão gênica pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR), e cinco (n=5) animais para exames histológicos.

Tabela 1 Distribuição da amostra de acordo com o tempo de experimento.

PERÍODO EXPERIMENTAL	GRUPO CONTROLE (n=40)		GRUPO EXPERIMENTAL (n=40)	
	RT-PCR (n=20)	Histológico (n=20)	RT-PCR (n=20)	Histológico (n=20)
3 dias	n=5	n=5	n=5	n=5
7 dias	n=5	n=5	n=5	n=5
14 dias	n=5	n=5	n=5	n=5
21 dias	n=5	n=5	n=5	n=5

RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; n: amostral.

Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em gaiolas plásticas específicas para este fim, na proporção de três animais por gaiola, que permaneceram forradas com raspas de madeira seca (maravalha de pinus), material totalmente inofensivo, atóxico e não comestível pelos animais. A maravalha foi substituída diariamente, fornecendo condições de higiene necessárias ao bem-estar e saúde dos animais. O fotoperíodo foi eletronicamente controlado com intervalos dia/noite de 12 horas e temperatura de 24°C, com variação média de 2°C.

Os animais receberam dieta padrão comercial, constituída por ração granulada (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S/A, Brasil), a qual foi moída para

evitar possível avaria ou deslocamento do aparelho ortodôntico, e posteriormente autoclavada, como medida preventiva à contaminação. Previamente à montagem do dispositivo ortodôntico, os animais permaneceram por um período de adaptação (quatorze dias) à alimentação, com monitoramento do peso corporal. Água mineral foi fornecida através de dispensadores apropriados adaptados à gaiola, com bico de aço inoxidável, com capacidade de 500 ml, para garantir suprimento constante aos animais. A ração e a água eram disponibilizadas *ad libitum*, substituídas diariamente, e os respectivos recipientes higienizados.

3.2 PROCEDIMENTOS ANESTÉSICOS

Cada animal do GC e do GE foi sedado com anestésico cloridrato de cetamina, na dosagem de 80 mg/kg de peso corporal (Ketamina 10%, Agener, Brasil) associado a xilazina (Dopaser, Laboratórios Calier S.A., Espanha) na dosagem de 5 mg/kg de peso corporal, por via intramuscular.

3.3 CONFECÇÃO, INSTALAÇÃO E ATIVAÇÃO DO DISPOSITIVO ORTODÔNTICO PARA ERM

Os procedimentos operatórios foram realizados na sala de Cirurgia Experimental do Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em condições assépticas.

Os animais do GE foram anestesiados e posicionados em decúbito dorsal em mesa operatória apropriada. Foi realizada a expansão rápida da maxila, cujo mecanismo de força era constituído de uma mola passiva (Figura 1, página 10) de 1,5 mm de largura, de fio de latão de 0,5 mm de diâmetro (Tecnident, Brasil), confeccionada com alicate nº 139 (Ormco Corporation, Estados Unidos) e alicate

para corte de fio espesso (Dentaurum, Alemanha). Este dispositivo ortodôntico foi adaptado e fixado entre os incisivos, semelhante ao modelo apresentado na literatura (Sawada e Shimizu, 1996; Saito e Shimizu, 1997; Da Silva *et al.*, 2012; Arnez *et al.*, 2017), com o intuito de possibilitar a correta calibração e padronização da força para todos os animais, e permitir manter a separação da sutura palatina mediana.

A espessura da mola demonstrou que 1,5 mm de separação entre os incisivos induz a taxa máxima de disjunção na sutura palatina mediana, sem diminuição do peso corpóreo do animal (Sawada e Shimizu, 1996; Saito e Shimizu, 1997). A força utilizada foi de 150 g, sendo medida com auxílio de um dinamômetro (1303 ETM, Ormco Corporation, Estados Unidos) de alta precisão de uso ortodôntico.

Todos os dispositivos ortodônticos foram confeccionados e instalados pelo mesmo operador e assistente, seguindo sempre o mesmo protocolo.

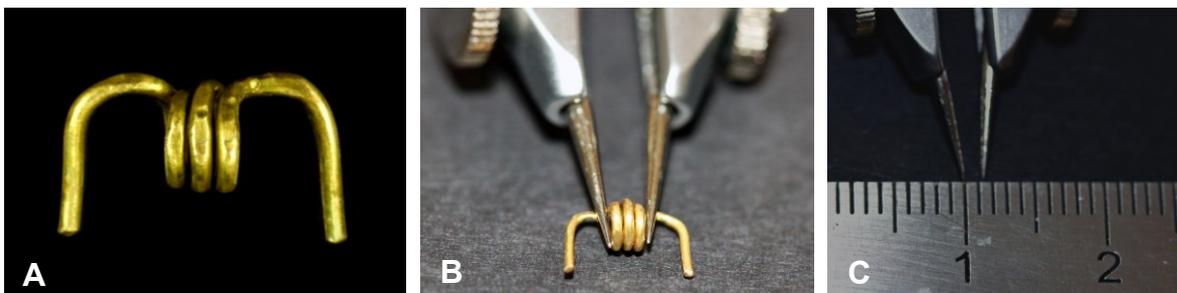


Figura 1 Dispositivo ortodôntico utilizado para ERM nos animais (A). Compasso de pontas secas evidenciando o comprimento da mola (B), aferido em 1,5 mm em régua milimetrada (C).

As faces vestibular e distal do terço médio dos incisivos superiores foram preparadas para reter e estabilizar o dispositivo ortodôntico (Figura 2A, página 12), utilizando broca esférica diamantada nº 1011 (K.G. Sorensen, Brasil) em motor de alta rotação (Dabi-Atlante, Brasil), confeccionando sulcos rasos em esmalte.

Em sequência, foi realizada a profilaxia dos incisivos com pasta de pedra pomes e água aplicada em taça de borracha (Microdont, Brasil) em contra-ângulo adaptado ao micromotor (Dabi-Atlante, Brasil). Realizou-se a lavagem com *spray* de água, secagem com ar da seringa tríplice, e condicionamento do esmalte com ácido ortofosfórico a 37% em forma de gel (Condac 37, FGM, Brasil), durante 15 segundos, conforme recomendações do fabricante. Fez-se a lavagem com água por 30 segundos e secagem das superfícies dentárias com ar da seringa tríplice. Pequena quantidade de agente de união (Primer Transbond XT, 3M Unitek, Estados Unidos) em *microbrush* foi aplicado sobre a superfície condicionada do esmalte, seguido por rápido jato de ar, e fotoativação por luz led (470nm) durante 20 segundos (fotopolimerizador Optilight Max, Gnatus, Brasil). Incrementos de resina fotopolimerizável (Transbond XT, 3M Unitek, Estados Unidos) foram adaptados sobre o segmento de fio nas faces vestibular e distal dos incisivos superiores, recobrimo-o com auxílio de espátula para resina (Suprafill 1/2", S.S.White Duflex, Brasil), seguida pela fotopolimerização durante 30 segundos, em orientação oclusal, vestibular, mesial e distal de cada incisivo. Para compensar o desgaste da resina decorrente do contínuo hábito roedor dos animais, vários incrementos de resina foram fotopolimerizadas sobre o grampo para protegê-lo das interferências dos incisivos inferiores. Concluída a montagem do aparelho, foi feito um desgaste em altura no esmalte dos incisivos inferiores (Figura 2B, página 12) com broca tronco-cônica diamantada nº 3070 (KG Sorensen, Brasil) em alta rotação, sob refrigeração, para permitir correta oclusão e evitar interferências no ato mastigatório que pudessem deslocar o aparelho ortodôntico.

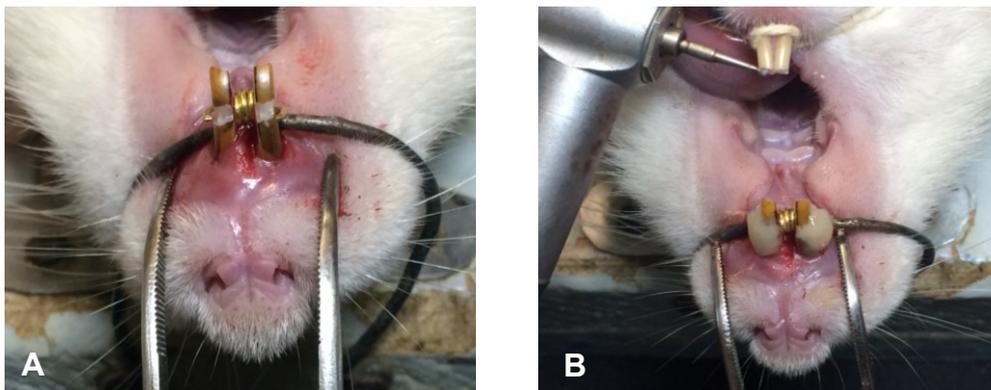


Figura 2 Adaptação e estabilização do dispositivo ortodôntico entre os incisivos após ERM (A) e desgaste em altura dos incisivos inferiores após finalização da montagem do aparelho (B).

Após a ativação inicial, o aparelho não recebeu ativação adicional durante o experimento, e seu correto posicionamento foi conferido diariamente quanto à posição, estabilidade e necessidade de correções na eventualidade de estar ocasionando injúrias à mucosa oral do animal.

Os espécimes que não mais apresentassem a resina em posição, no decorrer do experimento, foram anestesiados para um novo recobrimento de resina nessa posição, evitando o contato direto dos incisivos inferiores sobre o aparelho.

3.4 RADIOGRAFIA DA SUTURA PALATINA MEDIANA

O exame radiográfico (Figura 3, página 13) foi realizado nos animais do GC e GE, no momento da eutanásia, para certificar-se da situação da sutura palatina mediana. Esta apresentou-se intacta nos grupos que não foram submetidos à ERM (Figura 3A) e aberta após ERM (Figura 3B). As radiografias foram realizadas neste período para que fossem possíveis de comparações e sem sobreposições ósseas.

Os animais foram radiografados utilizando filmes oclusais (Insight, Kodak, Estados Unidos) posicionados paralelos à sutura palatina mediana, envolvendo toda a maxila. Utilizou-se o aparelho de raio-x (Kavo, Funk RX 10, Brasil) calibrado com tempo de exposição de 0,5 segundos, 10 mA e 60 KV. Os filmes radiográficos foram revelados em soluções de revelador (Kodak GBX, Estados Unidos) e fixador (Kodak GBX, Estados Unidos) de acordo com a técnica de temperatura e tempo, com lavagem intermediária em água durante 30 segundos e fixação por 15 minutos. Posteriormente, as radiografias foram colocadas em água corrente por 20 minutos e a secagem foi obtida em temperatura ambiente (25°C).

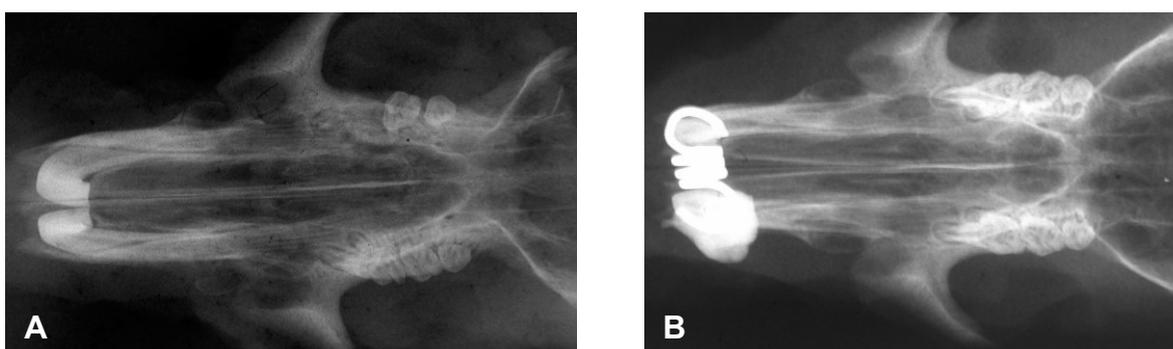


Figura 3 Imagens do exame radiográfico ilustrando a sutura palatina mediana antes do procedimento (A), e abertura da mesma após a ERM (B).

3.5 ACOMPANHAMENTO CLÍNICO

Foi realizado exame clínico intraoral periodicamente para verificar a condição dos tecidos moles adjacentes ao aparelho ortodôntico, bem como a análise do peso corporal durante os períodos experimentais para apurar se a instalação do aparelho interferiu no peso dos animais.

3.6 EUTANÁSIA

Todos os animais do GC e GE foram anestesiados, via intramuscular, com cloridrato de cetamina (Ketamina 10%, Agener, Brasil) na dosagem de 80 mg/kg de peso corporal e xilazina (Dopaser, Laboratórios Calier S.A., Espanha) na dosagem de 20 mg/kg de peso corporal. Os animais destinados para análise histológica foram eutasiados com perfusão intracardíaca seguida de decapitação para obtenção das maxilas, e os destinados para análise de RT-PCR foram decaptados sem perfusão intracardíaca para obtenção do tecido pulpar.

3.7 COLETA DAS AMOSTRAS

3.7.1 Coleta e processamento das amostras para RT-PCR

Uma lâmina de aço estéril foi utilizada para separar as hemimaxilas no sentido ântero-posterior, perpendicular ao plano oclusal, no centro do palato, equidistante dos molares superiores esquerdos e direitos, para extrair os incisivos superiores e facilitar a coleta das polpas dentárias. Para obtenção destas, a técnica consistiu no descolamento do tecido pulpar das paredes do canal radicular com lima manual estéril tipo Kerr (nº 10, 21 mm, Dentsply-Maillefer, Suíça), e extração com extirpa nervos estéril (nº 15, 21 mm, Dentsply-Maillefer, Suíça), por acesso apical (Figura 4).



Figura 4 Extração da polpa de incisivo superior por acesso apical.

O tecido pulpar foi banhado em tampão fosfato salino 0,1 M (PBS; pH 7,2 - 7,4) com a finalidade de remover sangue residual e outros eventuais contaminantes, e armazenadas em criotubos estéreis previamente identificados por grupo e período experimental, contendo solução para preservação e estabilização do RNA tecidual (RNAlater, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos). Cada criotubo continha tecido pulpar de 10 dentes (incisivos superiores esquerdo e direito), formando um *pool* de polpas dentárias. Os criotubos foram transportados e acondicionados em freezer -80°C até o momento da extração de RNA total para a realização do RT-PCR.

3.7.2 Coleta e processamento das amostras para Histologia

Após anestesia, o sacrifício dos animais destinados à Histologia foi realizado através de perfusão intracardíaca, com a introdução de cânula metálica no ventrículo esquerdo dos animais, com 200 ml de PBS 0,1 M seguido por 200 ml de solução fixadora de paraformaldeído a 10% tamponado em PBS 0,1 M, ambos na quantidade de 7% do peso corporal do animal. O tempo de perfusão para cada animal foi de aproximadamente de 10 a 15 minutos, visando maior eficiência e rapidez na fixação dos tecidos. Finalizada a perfusão, procedeu-se à decapitação com guilhotina (Insight, Brasil), excisão dos tecidos moles da cabeça com tesoura de ponta romba estéril, e remoção da maxila, preservando a sutura palatina mediana e os incisivos para o preparo histológico.

As maxilas foram mergulhadas em solução fixadora de paraformaldeído 10% tamponado com PBS 0,1 M, a 4°C, por 48 horas para completar a fixação. As peças foram lavadas em PBS 0,1 M, por 3 vezes, durante 10 minutos, e em seguida descalcificadas com solução desmineralizadora de etileno-diamino-

tetracetato-dissódico a 10% 0,25 M (EDTA; pH 7,0), sob agitação constante, à temperatura de 2 a 8°C, por aproximadamente 40 dias. Esta solução foi trocada a cada 72 horas, até que a agulha do teste de punção fosse introduzida sem resistência, quando a peça atingiu o ponto ideal de descalcificação. Remanescentes do aparelho ortodôntico foram removidos das peças com alicate de corte de amarelo (Ormco Corporation, Estados Unidos), e realizou-se o preparo macroscópico das peças desmineralizadas utilizando uma lâmina de navalha para cada uma das maxilas, onde obteve-se um corte inicial frontal 2 mm à frente dos primeiros molares superiores, dividindo a maxila em dois segmentos, anterior (incisivos) e posterior (molares).

Os segmentos anteriores das maxilas foram banhados em água corrente por 2 horas para remoção total do EDTA, seguidas de desidratação rigorosa em concentrações crescentes de álcool metílico absoluto (Merck, Alemanha), renovando os álcoois 70%, 90%, 100%, sucessivamente, com a finalidade de evitar trocas osmóticas bruscas. As peças foram clarificadas em xilol (Merck, Alemanha) sendo submetidas a 3 banhos distintos, de 1 hora cada, tendo o xilol como auxiliar na substituição do álcool por parafina, em razão de ser miscível em ambas as substâncias. A parafinização foi realizada lentamente através de 3 banhos de parafina em estufa a 60°C, por 30 minutos cada um. Essas peças foram incluídas em parafina de baixa fusão (Dinâmica Química Contemporânea, Brasil) dentro de um molde metálico retangular, formando pequenos blocos. Durante a inclusão propriamente dita, as peças foram orientadas para obtenção de cortes longitudinais, paralelo ao longo eixo da sutura palatina mediana.

De cada peça incluída na parafina, foram obtidas fitas de cortes histológicos semi-seriados de 5 µm em micrótomo automático (RM 2155, Leica

Microsystems, Alemanha), em intervalos de 30 μm , as quais foram levadas ao banho histológico a 37°C para serem distendidas e possibilitar a coleta em lâminas silanizadas para microscopia (76x26x1mm, Knittel, Alemanha), padronizando-se 3 cortes em cada uma. Em sequência, as lâminas foram posicionadas em placa histológica aquecida a 37°C para favorecer a aderência do material, e posteriormente mantidas em estufa em posição vertical para secagem, por 24 horas, a 37°C.

3.8 COLORAÇÕES DAS AMOSTRAS PARA HISTOLOGIA

As lâminas destinadas à análise histológica foram coradas com Hematoxilina e Eosina, e Tricrômico de Masson. Três cortes mais centrais de cada peça foram selecionados para Tricrômico de Masson, e serviram como guia para a escolha dos outros, sendo três cortes diretamente antes e três cortes diretamente depois para a coloração de Hematoxilina e Eosina.

3.8.1 Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE)

Iniciou-se com a desparafinização das lâminas através da eliminação da parafina dos cortes em soluções I, II e III de xilol (Merck, Alemanha), com duração de 10 minutos/solução. Em seguida foi feito o processo de hidratação com banhos de álcool absoluto (Merck, Alemanha) I, II, III, com duração de 3 minutos cada um, e álcool 95% por 3 minutos, até chegar à lavagem com água destilada. Os cortes hidratados foram submetidos à coloração por hematoxilina (Merck, Alemanha) por 10 segundos, seguidos pela lavagem das lâminas em água corrente por 5 minutos, até os tecidos assumirem tom roxo, sendo, então, mergulhadas em eosina (Merck, Alemanha) por 1 minuto, dando aos tecidos a cor rósea. A seguir,

realizou-se rápida lavagem em nova solução de álcool 95%, seguida de banhos com novas soluções de álcool absoluto I, II e III com duração de 3 minutos/solução, quando as lâminas foram submetidas aos banhos de xilol I, II e III com duração de 10 minutos/solução. As lâminas foram cobertas com lamínulas de vidro para microscopia (24x60mm, classe 1, Knittel, Alemanha), montadas com Entellan (Merck, Estados Unidos), e após 24 horas de secagem à temperatura ambiente (25°C) foram acondicionadas em caixas apropriadas identificadas e armazenadas em ambiente seco e fresco.

3.8.2 Coloração com Tricrômico de Masson (TM)

As etapas de desparafinização, hidratação e lavagem das lâminas em água destilada seguiu os mesmos parâmetros da Coloração em HE. Posteriormente, os cortes foram incubados em hematoxilina (Merck, Alemanha) por 5 minutos, seguidos pela lavagem das lâminas em água destilada por 5 minutos, sendo, então, mergulhadas em solução de Cromotrop 2R (cromotrop + azul de anilina + ácido fosfotungstico + água destilada) por 20 minutos. A seguir, realizou-se rápida lavagem em nova solução de álcool 95%, com sequência de banhos em novas soluções de álcool absoluto I, II e III com duração de 3 minutos/solução, e xilol I, II e III com duração de 10 minutos/solução. As lâminas foram cobertas com lamínulas de vidro montadas com Entellan (Merck, Alemanha), e após 24 horas de secagem à temperatura ambiente (25°C) foram acondicionadas em caixas apropriadas identificadas e armazenadas em ambiente seco e fresco.

3.9 AQUISIÇÃO DAS IMAGENS HISTOLÓGICAS

As imagens histológicas coradas com HE e TM foram obtidas com o auxílio do microscópio óptico (BX61, Olympus Corporation, Japão) acoplado a câmera de captação de imagem (DP72, Olympus Corporation, Japão) conectada ao microcomputador desktop (Dell Inc., Estados Unidos), contendo o *software* DP2-BSW versão 2.1 (Olympus Corporation, Japão) para captura e análise de imagens digitalizadas.

Foram capturadas um total de 240 imagens dos animais de todos os períodos do GC e GE, com objetivas de 20x e 40x, para visualização, identificação das estruturas e tipos celulares do tecido pulpar, e estereologia de vasos sanguíneos.

3.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A análise histomorfológica dos resultados foi realizada por um único examinador devidamente treinado. O objetivo foi investigar os eventos morfológicos que ocorreram na polpa dentária, focando na presença de alterações celulares, teciduais e vasculares.

A vitalidade do tecido pulpar foi analisada considerando-se como critério de avaliação qualitativa a presença de tecido conjuntivo com a camada de odontoblastos, delimitando as bordas internas do tecido pulpar.

3.10.1 Análise microscópica do tecido conjuntivo pulpar

As polpas dentárias dos dentes de ancoragem foram avaliadas para diagnosticar o estado pulpar quanto à presença ou ausência dos fenômenos discriminados a seguir, seguindo uma adaptação do método proposto por

Massaro *et al.* (2009): I) Padrão de celularidade: a) infiltrado inflamatório, b) celularidade reduzida, c) fibrosamento aumentado; II) Alterações distróficas: a) hialinização, b) nódulos pulpares, c) calcificação difusa, d) metamorfose cálcica da polpa, e) necrose; III) Alterações hemodinâmicas: a) congestão vascular, b) hemorragia, c) trombose; e IV) Alterações dentinárias: a) dentina reacional, b) túbulos dentinários nucleados. Os registros foram contabilizados, e após análise, os dados dos eventos teciduais presentes foram tabulados e submetidos à análise estatística.

3.10.2 Análise microscópica do tecido inflamatório

Foi realizada a análise histomorfométrica pelo método estereológico ou casualização de amostra, que consiste em determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes histológicos, com intuito de eliminar a ocorrência de vício na amostragem. O referido método baseia-se no princípio geométrico-estatístico, derivado da probabilidade das imagens e dos perfis da estrutura no corte histológico, resultando num sistema-teste efetivo. Portanto, realizaram-se os procedimentos de escolhas aleatórias para as seguintes fases do experimento: seleção dos animais, dos blocos histológicos, das lâminas histológicas, dos cortes e campos histológicos.

Para os cortes corados por HE e TM foi realizada uma análise quantitativa da intensidade do processo inflamatório, utilizando o *software* ImageJ versão 1.48 (National Institutes of Health, Estados Unidos). Posteriormente, a quantificação foi baseada em critérios descritos na literatura por Wolfson e Seltzer (1975), e Holland *et al.* (2007), onde foram atribuídos escores de 1 a 4 aos diferentes

eventos listados na Tabela 2. Os registros foram tabulados, e submetidos à análise estatística.

Tabela 2 Escore do grau de inflamação adaptado de Wolfson e Seltzer (1975), e de Holland *et al.* (2007).

ESCORE	CARACTERIZAÇÃO
1	Ausência ou presença ocasional de células inflamatórias
2	Pequeno número de células inflamatórias, até 10 células/campo (aumento de 40x)
3	Moderado número de células inflamatórias. De 11 a 50 células/campo (aumento de 40x)
4	Grande número de células inflamatórias. Acima de 50 células/campo (aumento de 40x)

Para avaliar semi-quantitativamente o escore do grau de inflamação e facilitar seu entendimento, foram realizadas fotomicrografias deste estudo, de cada evento descrito anteriormente, ilustradas abaixo:

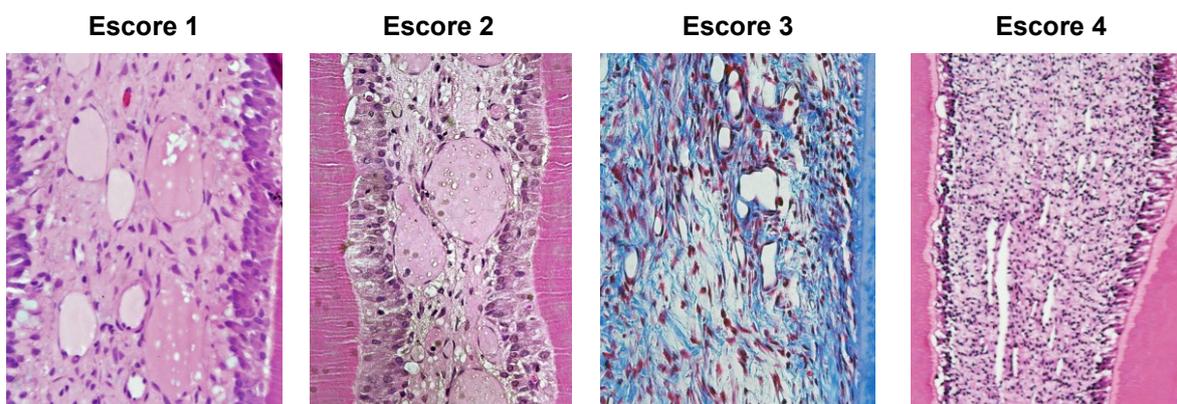


Figura 5 Imagens ilustrativas do escore histológico da intensidade de inflamação no tecido pulpar.

3.11 ANÁLISE HISTOMÉTRICA DO TECIDO PULPAR

3.11.1 Quantificação da densidade do volume de perfis de vasos sanguíneos

Os vasos sanguíneos da polpa coronária dos incisivos superiores do GC e GE foram quantificados através da Estereologia, de acordo com o Princípio de Delesse (Mandarim-De-Lacerda, 1995; 1998; 1999), que é um método quantitativo que obtém dados diretamente da microscopia óptica, utilizando sistemas-teste

compostos usualmente por pontos e linhas inseridos em uma área-teste específica.

Para obter a densidade do volume de perfis de vasos sanguíneos, foram utilizadas 15 imagens de cada período do GC e GE, no aumento de 40x, contendo cortes do terço médio da polpa dentária. Uma grade quadrilátera de 96 pontos foi sobreposta à área do tecido pulpar (Figura 6), utilizando o *software* ImageJ versão 1.48 (National Institutes of Health, Estados Unidos), e os pontos de intersecção foram contados, obtendo-se a densidade volumétrica de perfis de vasos sanguíneos no tecido (Vv).

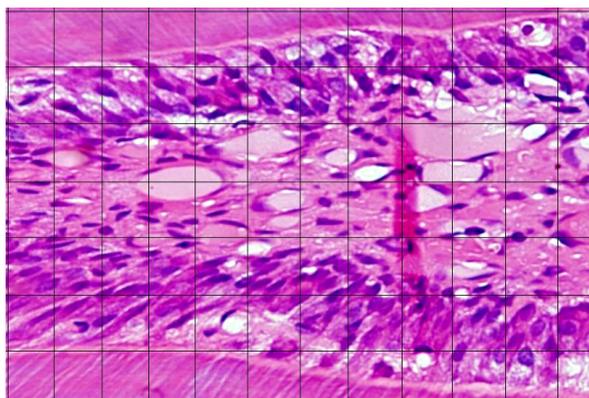


Figura 6 Grade de 96 pontos do *software* ImageJ utilizada para quantificação dos vasos sanguíneos.

Utilizando a metodologia de Mandarim-De-Lacerda (1995; 1998; 2003), a densidade volumétrica em porcentagem foi obtida pela fórmula específica (Σ Pontos teste - pontos contados / Σ Pontos totais - 96 pontos) x 100, onde a densidade de volume dos vasos sanguíneos (Vv) é determinada pela divisão dos pontos total que interseccionam as estruturas de interesse (ΣP_{teste}), sobre os pontos totais da grade sistema utilizada (grade de 96 pontos) (ΣP_{total}):

$$Vv (\%) = \frac{\Sigma P_{\text{teste}}}{\Sigma P_{\text{total}}}$$

A densidade de volume (V_v) mede a ocupação relativa da área-teste pela área das imagens da estrutura avaliadas, sendo que a lei básica da Estereologia nos informa que a quantidade relativa de pontos que tocam a estrutura é comparável à quantidade de área desta estrutura contida na área-teste. Este parâmetro é uma porcentagem simples e determina o quanto da estrutura de interesse ocupa em relação à área-teste estudada.

3.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

A técnica de RT-PCR é usada para detectar e semiquantificar a expressão da mensagem, de pequenas quantidades de RNA (Bustin, 2000). Esta metodologia combina a síntese de cDNA a partir de moldes de RNAm, através da enzima Transcriptase Reversa, fornecendo um método rápido e específico para análise da expressão gênica (Wong e Medrano, 2005; Fleige *et al.*, 2006; Wagner, 2013).

3.12.1 Extração, isolamento e obtenção do RNA total

As polpas dos dentes de ancoragem foram descongeladas à temperatura ambiente (25°C) e remanejadas com pinça universal nº 317 (S.S.White Duflex, Brasil) para tubos de 2 ml estéreis identificados por grupo e período experimental.

Para extração do RNA total das células do tecido pulpar, as amostras foram pesadas, e foi adicionado 600 µl de tampão de lise (Lysis Buffer, PureLink RNA Mini Kit, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos), conforme protocolo do fabricante, seguida da trituração e homogeneização através de sonicador (T10 Basic Ultra-Turrax, Ika, Estados Unidos) em alta frequência, à temperatura ambiente (25°C). Em sequência, fez-se a centrifugação a 12.000 g, por 5 minutos,

a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo novo, ao qual foi adicionado 300 µl de álcool 70% e homogeneizado em vortex. A solução foi transferida para um tubo de coluna estéril contendo uma membrana central em sílica, e centrifugada novamente a 12.000 g, por 30 segundos, a 4°C. O filtrado contendo proteínas foi coletado, liofilizado e armazenado em tubos identificados no freezer a -80°C para futuras análises.

À coluna, foram adicionados 700 µl de tampão de lavagem I (Wash Buffer I, PureLink RNA Mini Kit, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos), centrifugado a 12.000 g, por 30 segundos, à 4°C, descartando-se o filtrado. Repetiu-se esta etapa por 2 vezes, utilizando-se 500 µl de tampão de lavagem II (Wash Buffer II, PureLink RNA Mini Kit, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos), descartando-se os filtrados.

A coluna contendo a membrana de sílica foi acoplada a um novo tubo coletor, submetido à centrifugação a 12.000 g, por 2 minutos, a 4°C, para secagem da membrana de sílica. Foram adicionados 40 µl de água livre de enzima RNA (RNase FreeWater, PureLink RNA Mini Kit, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos) sobre a membrana de sílica, e então submetida à centrifugação a 12.000 g, por 2 minutos, a 4°C. O filtrado obtido foi avaliado quanto à concentração e a pureza do RNA, determinadas pela leitura da densidade óptica (absorbância) das soluções de RNA total em nanoespectrofotômetro (ND 100, Nanodrop Technologies, Estados Unidos) nos comprimentos de onda de 230 a 280 nm. A relação A230/A260 foi considerada aceitável se estivesse acima de 2.0, e A260/A280 aceitável se estivesse entre 1.8 e 2.0, pois valores nesse intervalo indicam boa qualidade da amostra quanto ao quesito de contaminação (Pérez-Novo *et al.*, 2005; Wong e Medrano, 2005; Sambrook e Russell, 2006).

3.12.2 Síntese do cDNA

Foi utilizado 1 µg da amostra de RNA total para a síntese de cDNA, através da reação de transcrição reversa, utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos). Os ciclos com os tempos e as temperaturas foram programados de acordo com as instruções do fabricante dos reagentes, a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos, utilizando termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, Eppendorf, Itália). Os cDNAs obtidos foram diluídos 10 vezes em água livre de enzima RNA (RNase FreeWater, PureLink RNA Mini Kit, ThermoFisher Cientific, Estados Unidos), e posteriormente armazenados a -20°C até a realização do RT-PCR.

3.12.3 RT-PCR

As reações de RT-PCR foram realizadas em termociclador (StepOnePlus Real-Time PCR System, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos), conforme recomendações do fabricante.

As amplificações por RT-PCR foram realizadas em duplicatas utilizando 2 µg de cDNA por reação, e a água livre de enzima RNase (RNase FreeWater, PureLink RNA Mini Kit, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos) foi usada como controle negativo. As reações foram preparadas com *TaqMan Fast Advanced Master Mix* (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos) adicionado aos *primers* contendo as sondas específicas para os genes alvos: *Vegf* (*Vegfa*, Rn01511602_m1, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos), *Cox-2* (*Ptgs2*, Rn01483828_m1, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos), *Dspp* (*Dspp*,

Rn02132391_S1, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos), e *Gapdh* (*Gapdh*, Rn01775763_g1, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos), gene de controle endógeno, denominado gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, utilizado como referência para a normalização dos valores (Bustin, 2000).

As condições de ciclagem térmica consistiram de: um ciclo inicial a 50°C por 2 minutos; ativação da enzima polimerase a 95°C por 20 segundos; e 40 repetições (ciclos de amplificação) para desnaturação a 95°C por 3 segundos, e anelamento e extensão da fita de cDNA a 60°C por 30 segundos, conforme orientações do fabricante. As leituras das amplificações dos genes na reação de PCR foram obtidas através do *software* StepOne Plus versão 2.3 (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos).

Os resultados das amplificações foram analisados com base no valor do ciclo limiar (C_t , *cicle threshold*), sendo este o ponto correspondente ao número do ciclo obtido na fase de amplificação exponencial das amostras que permite a análise quantitativa da expressão do gene avaliado. Os resultados individuais expressos em valores de C_t foram transferidos para planilhas e agrupados de acordo com o grupo animal (GC e GE) e período experimental, para a realização da análise estatística.

O cálculo de expressão relativa dos genes foi normalizado pela expressão na condição controle, ou seja, pela diferença entre ΔC_t das amostras (C_t do gene alvo – C_t do gene endógeno constitutivo) e a média obtida do ΔC_t dos animais controles, resultando os valores de $\Delta\Delta C_t$ de cada animal. Em seguida, foi realizado o cálculo da expressão de cada gene avaliado com base na equação descrita por Livak e Schmittgen (2001): Expressão Relativa = $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

3.13 PRECISÃO DA METODOLOGIA

Para a confiabilidade dos resultados desse trabalho, procurou-se minimizar os erros dos métodos de mensuração empregados. Calculou-se a precisão do investigador pelo erro sistemático intraexaminador. O erro sistemático reflete uma falta de padronização do método, uma vez que o examinador tende a sub ou superestimar os valores de suas medições de maneira inconsciente, de modo a direcionar os resultados de acordo com as expectativas em relação às conclusões do estudo.

Para estimar o valor do erro intraexaminador sistemático do método, a correlação intraclasse foi realizada previamente às leituras finais. Vinte cortes histológicos foram aleatoriamente selecionados e suas medições e escores foram feitas e repetidas 3 semanas após a primeira medição. As amostras processadas por RT-PCR foram novamente analisadas, 30 dias após a análise inicial. O coeficiente de concordância apresentou o valor de 0,87 que, corresponde, qualitativamente, a um nível satisfatório. Assim, observou-se que erros na verificação da precisão desse estudo foram admissíveis, promovendo resultados fidedignos.

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do RT-PCR e as medidas histológicas foram agrupados de acordo com o grupo animal (GC e GE) e período experimental (3, 7, 14 e 21 dias), organizados em tabelas e submetidos à análise estatística. Uma vez obtidos os dados, médias representativas de cada grupo foram submetidas a uma análise estatística com nível de significância de 5%. Para a análise intragrupo (efeito do tempo) foi utilizado o teste paramétrico de análise de variância (One-Way

ANOVA) e, quando detectada diferença estatisticamente significativa, o teste paramétrico de Tukey foi utilizado para detectar a diferença entre os grupos dentro do mesmo ensaio. A análise intergrupo (efeito do tratamento) testou a hipótese de que a ERM modifica a reparação vascular através da alteração do padrão de expressão gênica, por meio do teste paramétrico de análise de variância (Two-Way ANOVA) e, quando detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos GC e GE, o teste paramétrico de Bonferroni ($p < 0,05$) foi aplicado.

Para as medidas em escores, os dados foram agrupados e apresentados em medianas, intervalos interquartil, e o valor mínimo (variáveis ordinais) e máximo. O teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e os testes de Dunn ($p < 0,05$) foram utilizados para os escores. Para a densidade do volume de perfis de vasos sanguíneos (Vv) os dados foram apresentados como média e desvio padrão e, o teste Mann-Whitney foi utilizado para comparar esses dados.

Todos os testes estatísticos foram realizados com o *software* GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc., Estados Unidos), tendo sido adotado o nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$) para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas.

4 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

4.1 ARTIGO

GALISTEU-LUIZ, K.^a; SANT'ANNA, E.F.^b; MONTEIRO, P.M.^c, RIBEIRO, L.N.S.^d,
ISSA, J.P.M.^e; STUANI, M.B.S.^f; ARAÚJO, M.T.S.^g. **Analysis of pulpal changes
after rapid maxillary expansion in rats.**

Artigo a ser submetido à European Journal of Dentistry (**ISSN 1305-7464**).

^a Master's Degree Student, Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro Dental School, Rio de Janeiro, Brazil.

^{b,g} Associated Professor, Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro Dental School, Rio de Janeiro, Brazil.

^{c,d} PhD Student, Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

^e Associated Professor, Department of Morphology, Physiology and Basic Pathology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

^f Associated Professor, Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

Corresponding Author: Mônica Tirre de Souza Araújo

Department of Orthodontics, Dental School, Federal University of Rio de Janeiro
Av. Professor Rodolpho Paulo Rocco, 325 – Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ
CEP 21941-590, Tel: +55 (21) 2590-2727 Fax: +55 (21) 2590-2771.

Email: monicatirre@ortodontia.ufrj.br

ABSTRACT

Aims: To evaluate the effects of rapid maxillary expansion (RME) on the dental pulp of anchoring teeth of young rats by histological, histomorphological and gene expression analyzes. **Materials and Methods:** Eighty (n=80) male *Wistar* rats were randomly distributed into 2 groups: Control Group (CG, n=40), animals had no RME and were sacrificed at 3, 7, 14 and 21 days after the beginning of the experiment; and Experimental Group (EG, n=40), animals were submitted to RME and sacrificed in the same periods of the Control Group. Dental pulps of the upper incisors of twenty animals (n=20) of each group (CG and EG) were extracted for analysis of the mRNA gene expression by the RT-PCR technique for *Vegf*, *Dspp* and *Cox-2* genes, and 20 animals (n=20) for the histomorphological and histomorphometric analyses. **Results:** All groups that suffered RME showed signs of inflammation and increased blood vessel density, with transient changes on odontoblast layer. There was a significant increase of *Vegf* gene expression in all periods for experimental group, *Cox-2* increase only at 3rd and 7th days, and *Dspp* at 7th and 14th days. **Conclusion:** RME induced pulp tissue remodeling, with transient modulation of genes expression and vascularization.

Keywords: dental pulp, palatal expansion technique, gene expression, histology.

INTRODUCTION

The rapid maxillary expansion (RME) procedures use orthopedic forces, whose mechanics load are applied on the crown of teeth (Ong *et al.*, 2015). Forces load are transmitted to the supporting periodontium, inducing vascular and inflammatory changes not only in the suture but also in the periodontal and pulp

tissues of the anchoring teeth (Von Böhl *et al.*, 2012; Krishnan e Davidovitch, 2015).

Vascular changes are triggered by several mediators, including VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), a specific endothelial cell mitogen with a high capacity to increase vascular permeability, stimulating angiogenesis and neovascularization in pulpal tissue. It is involved in inflammatory processes and tissue reparation, demonstrating its correlation with the cyclooxygenase-2 enzyme (COX-2) (Davidovitch, 1991; Dvorak, 2002; Hicklin e Ellis, 2005).

COX-2 expression is induced in different tissues, and is found at higher concentrations in inflammatory processes conditions (Rouzer e Marnett, 2009). The catalysis of arachidonic acid from the cell membranes by COX-2 converts it into prostaglandins, prostacyclins and thromboxanes, highlighting the prostaglandins role on the pathogenesis of pulp disease (Fouad, 2009). Several evidences show that prostanoid production by COX-2 promotes VEGF expression, with subsequent angiogenesis, supporting data for a better understanding of the correlation between the intensity of the inflammatory process and the regenerative potential of pulp tissue (Güven *et al.*, 2007; Goldberg *et al.*, 2015).

Large-scale forces can cause changes in vascularization and pulp metabolism, culminating in degenerative changes or pathological mineral deposition in response to the dentin-pulpal complex aggression (Piattelli e Trisi, 1993). Studies show flaws in the neurological regulation of dentin secretory activity by odontoblasts during revascularization and reinnervation of the post-trauma pulp repair process (Andreasen *et al.*, 1987), or alterations in the sialophosphoprotein dentin (DSPP) mechanism, which actively promotes and controls the mineralization of collagen

fibers and the crystals growths inside the pre-dentin (Suzuki *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2014).

Indiscriminate mineral deposition on the pulp tissue may promote the clinical condition named pulp calcification (Seltzer e Bender, 1984), with reduction of the pulp chamber space, color change of the dental crown (McCabe e Dummer, 2012), presence of pulpal nodules, diffuse calcifications, and obliteration of the pulp chamber, which may compromise pulp vitality (Andreasen *et al.*, 1987; De Cleen, 2002).

Considering these important aspects above, the aim of this study was to investigate cellular, vascular and gene expression changes that encode the important tissue remodeling that occurs in the connective tissue of the dental pulp, submitted to rapid maxillary expansion, providing subsidies for a treatment therapy without compromising tissue integrity pulp.

MATERIALS AND METHODS

Eighty male *Wistar* rats were randomly distributed into Control Group (CG, n=40), did not receive RME and were sacrificed at 3, 7, 14 and 21 days after the beginning of the experiment; and Experimental Group (EG, n=40), submitted to RME and euthanized at the same periods of the Control Group. Animals received *ad libitum* water and food consisted of ground chow during all the experiment.

Animals were anesthetized (ketamine hydrochloride 80 mg/kg body weight and xylazine 5 mg/kg body weight) intramuscularly. Force mechanism consisted of a 1.5 mm wide passive spring of 0.5 mm diameter brass thread (Tecnident, Brasil), which was adapted and fixed between the upper incisors after RME, similar to the literature (Sawada e Shimizu, 1996; Arnez *et al.*, 2017). Employed force was 150 g

and this was measured using a high precision dynamometer for orthodontic purposes. The orthodontic device received no additional activation during the experiment.

Previously to euthanasia, CG and EG animals were anesthetized, and radiographic examination was performed to confirm the situation of the medial palatine suture in animals, intact in the CG and open in the EG. Maxilla structures were dissected and histologically processed. Hematoxylin and Eosin and Trichrome of Masson staining were done for histomorphological analyses of pulp tissue. Pulp of the anchoring teeth were extracted by apical access, and stored at -80 °C freezer to analysis of gene expression.

Morphological events that occurred in the dental pulp were analyzed for cellular, tissue and vascular alterations. Presence or absence of the phenomena were evaluated, considering adaptations of the Massaro *et al.* (2009) method. Histomorphometric method was employed to quantify the volumetric density of blood vessel profiles (Vv), according to Mandarim-De-Lacerda (1995; 2003) methodology. Quantitative analysis for the intensity of inflammatory process was done using criteria described by Wolfson and Seltzer (1975), and Holland *et al.* (2007).

Analysis of gene expression from pulp tissue was done using PureLink RNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, USA). 1 µg of total RNA was used for cDNA synthesis by the High Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher Scientific). PCR reactions for amplification of the genes of interest were prepared with TaqMan Gene Expression Assay (ThermoFisher Scientific) added to the primers containing the probes specific for the genes: *Vegf* (*Vegfa*, Rn01511602_m1, ThermoFisher Scientific), *Cox-2* (*Ptgs2*, Rn01483828_m1,

ThermoFisher Scientific), *Dspp* (*Dspp*, Rn02132391_S1, ThermoFisher Scientific), and *Gapdh* (*Gapdh*, Rn01775763_g1, ThermoFisher Scientific), endogenous control gene. Results were analyzed according to Livak and Schmittgen (2001) methodology.

Statistical Analysis

Data were analyzed and submitted to statistical tests using GraphPad Prism software version 5 (GraphPad Software Inc., USA), adopting the significance level of 5% ($p < 0.05$).

RESULTS

In CG, at 3, 7, 14 and 21 days, the odontoblasts were adjacent to the pre-dentin layer, with the cell body at the periphery of the pulp and the cytoplasmic extension crossing the pre-dentin layer and penetrating the dentinal tubules (Figure 1A). EG showed that the anchoring teeth moved to distal. On 3rd day after RME, the odontoblasts remained juxtaposed with each other, but with some hypertrophic nuclei and cytoplasm plus basophil, mainly on the distal surfaces of the anchoring teeth. Weil zone, characterized by the cells absence, disappeared in regions where the odontoblast layer was altered, with large cells (Figure 1B). On 7th day of RME, odontoblasts reestablished normal appearance, and cell-free zone was seen again. Cell-rich zone is distinguished from central portion of the pulp by the large number of cells per unit area, mainly fibroblasts and undifferentiated mesenchymal cells. EG presented the higher concentration of these cells, mainly at 3 to 7 days after RME. Fibroblasts predominated in central region of the CG pulp tissue, with a homogeneous distribution, and less frequently, around the blood vessels.

Intercellular substance of fibrillar nature was characterized by sparse collagen fibers, distributed indefinitely, with rare fiber bundle formations (Figure 1C).

At 3 and 7 days of the EG, fibroblast nuclei were distant from each other due to the large amount of amorphous intercellular substance, suggesting an interstitial fluid accumulation and edema. Small areas of hemorrhage were observed in central area of the pulp tissue, characterized by erythrocytes accumulation (Figure 1D).

All analyzed periods of the EG showed vasodilation, with larger vessels near the odontoblasts layer. For 3 and 7 days after RME, occurred vascular proliferation with leukocytes and erythrocytes inside and outside of the blood vessels, suggesting hemorrhagic areas. These cells number decreased over the 14 and 21 day periods, although defense cells such as neutrophils, eosinophils and erythrocytes were present in all experimental periods (Figure 1E). At 3 and 7 days, some blood vessels were congested and often showed a light purple coloration, suggesting plasma protein presence.

Pulp changes were categorized and tabulated according to Table 1. Some criteria were not statistically evaluated, because they remained totally unchanged.

In all analyzed periods of the CG e EG, phenomena of reduced cellularity or increased tissue fibrosing were not observed.

For CG, the cellularity pattern and structure of the extracellular matrix remained unchanged in all periods, with the presence of rare inflammatory cells, consistent with normality. There was no statistical difference between the scores at different times ($p=0.54$) (Figure 2).

EG, at 3, 7 and 14 days showed high intensity of inflammatory cells, mainly monocytes and neutrophils (polymorphonuclear cells), as well as macrophages.

However, at 21 days ($p=0.0046$), lesser tissue inflammation was seen compared to 3 days, with some intact fibroblasts and disorganized collagen fibers. Decrease in the number of inflammatory cells was seen at 14th day compared to 3rd day ($p < 0.05$). All EG periods presented greater amount of tissue inflammation than CG ($p < 0.05$) (Figure 2).

Dystrophic alterations such as presence of hyalinized tissue, pulpal nodules, diffuse calcification, calcium metamorphosis and necrosis were not observed, both in CG and in EG (Table 1).

Vascular proliferation was observed in EG, with dilated and congested vessels, filled by blood components, predominantly by erythrocytes. Presence of hemorrhagic areas containing neutrophils, lymphocytes, red blood cells and monocytes were more frequent at 3rd and 7th day of RME, and less frequently at 14th and 21th days (Figure 1F).

CG pulps at 3 days showed V_v mean of 6.4% and, after RME, there was a significant increase to 13% ($p=0.0016$). At 7 days, the volume density of blood vessels (V_v) increased significantly 9.70% in relation to the CG ($p=0.0024$). After 14 days, there was a reduction of these values (8.57%, $p=0.0083$) compared to 3 days, and at 21 days the V_v was 7.71% ($p=0.0088$), value close to the CG (Table 2).

The dentin was normal (Figures 1A and 1E), and it was not observe in any of the studied groups and period, tubules with nuclei or reactionary dentin. The odontoblastic layer eventually presented cells with vacuolization and some rupture points in its continuity, associated to technical artifacts.

mRNA for *Vegf* in EG was expressed in all periods, presenting a significant increase ($p < 0.001$) when compared to CG in the same periods (Figure 3A). For CG,

there was a significant decrease only at 14 days ($p < 0.01$), whereas in the periods of 3 and 21 days of the EG, the highest expression of this gene was found ($p < 0.001$) (Figure 3B).

Increase expression of *Cox-2* mRNA at 3rd ($p < 0.001$) and 7th days ($p < 0.05$) was found for EG compared to CG. However, from 3 days there was a decrease in *Cox-2* expression in the EG, and was not statistically significant at 14 and 21 days (Figure 3C). A decrease from 3 days in EG in all periods ($p < 0.001$) was observed, with no significant difference between the analyzed CG periods (Figure 3D).

Figure 3E, *Dspp* mRNA expression was lower at 3rd day period of EG versus CG ($p < 0.001$). However, there was an increase in gene expression at 7 and 14 days of the EG ($p < 0.01$). Figure 3F shows an increase from 3rd day in all periods of the EG ($p < 0.001$), with no significant difference between the analyzed CG periods.

DISCUSSION

Most of the studies describe the reactions in the medial palatine suture and the periodontium of the anchoring teeth, and there are few reports of pulpal changes involving large-scale forces (Kayhan *et al.*, 2000; Taşpınar *et al.*, 2003; Von Böhl *et al.*, 2012; Baratieri *et al.*, 2013).

Histological data showed an increase in cells presence and signs of inflammation in pulp tissue up to 14 days after RME, and a higher volume density of blood vessel profiles in all periods of the EG, with a tendency to return to CG values at 21th day. Association of these events showed that RME triggered an inflammatory response in the pulp tissue and increased vascularization in all the analyzed periods. Güven *et al.* (2007) and Caviedes-Bucheli *et al.* (2011; 2017)

describe this event as a temporary condition of neurogenic inflammation, started by mechanical stimulation of the sensory nerve fibers of the pulp tissue and the periodontium, with a transient increase in vascular permeability. Some authors (Nixon *et al.*, 1993; Yamaguchi e Kasai, 2007) explain the occurrence of homeostasis dynamics considering the orthodontic forces, showing an initial phase of increased blood flow in the pulp tissue and cellular changes. These phenomena promote neurovascular reorganization in the tissue, and there is a tendency to come back from the normality conditions (Babacan *et al.*, 2010). It is possible to observe compatibility of these results with the current literature as mentioned above. Intensity of the inflammatory process and the vascularization of EG reduced significantly at 21 days, during which time much of the force load was dissipated.

In this study, was observed the correlation of inflammatory and vascular effects. The substantial increase in Cox-2 mRNA expression in the early periods after RME confirms the histological findings, with increase inflammatory cells and signs of inflammation in the pulp tissue, such as vasodilation, edema, hyperemia and hemorrhage. The presence of VEGF and COX-2 in inflammatory processes has been highly correlated, considering the VEGF release occurs through a COX-2-dependent pathway. The prostanoids production by COX-2 stimulates the production of VEGF, initially causing increased blood supply, inflammatory cells, nutrients and oxygen to the site of inflammation, and consequently, increase of tissue vascularization (Güven *et al.*, 2007). The increased volume density of blood vessel profiles (Vv) and *Vegf* expression in the same experimental periods reaffirm the interrelation between *Cox-2* and *Vegf* expression, at a moment whose strength has not yet been dissipated.

Transduction of mechanical forces from RME to extracellular matrix induces changes in the pattern of gene expression (Krishnan e Davidovitch, 2006). This phenomenon can be observed between the expression of *Vegf* and *Cox-2*, and its reflexes in the pulp tissue. The decrease intensity of inflammatory cells during the increase of periods for EG are confirmed by the gene expression profile of *Cox-2* mRNA in EG, in the same periods. Likewise, there is an increase in the expression of *Vegf* mRNA in all periods of the EG, and consequent increase in the density of blood vessels of pulp tissue.

Severity of the inflammatory response caused by aggressive agent exerts a great influence on the extent of pulp injury (Caviedes-Bucheli *et al.*, 2008). Production of exudate and hyperemia generated in the inflammatory process can lead to an excessive accumulation of tissue fluid, allowing the vascular collapse of the pulp (Bhaskar, 1989). Considering that it is confined within a rigid framework of dentin and enamel, it can prolong the duration and aggravate the inflammatory process, with extensive insults and sequelae (Nanci, 2013). This situation was not characterized in the current study, because at 21 days of RME the inflammatory process was partially resolved. There was a significant reduction of inflammatory cell infiltrate and lower frequency of hemorrhagic areas, hyperemia and vasodilatation, when compared to the initial periods of 3 and 7 days. It is pertinent to affirm that because it is a connective tissue, the pulp has a high capacity for repair, with excellent regenerative properties and vascularization (Seltzer e Bender, 1984), recovering from the trauma generated by RME. For this, there must be favorable conditions, and that this tissue has not suffered previous injuries (Rotstein e Engel, 1991).

However, the intensity of aggressor agent may be a critical factor for pulpal repair. It is known that the nervous and vascular involvement, specifically the absence of collateral circulation of the pulp, is the main etiological factor for the pulp degeneration during the external forces application (Guevara e Mcclugage, 1980). Low and intermittent forces, and adequate recovery time reduces damage to the pulp tissues, although they may still exert some deleterious effect on the odontoblast layer (Mostafa *et al.*, 1991). In contrast, intense forces may result in degeneration, necrosis or hypertrophy of odontoblasts during orthodontic tooth movement (Guevara e Mcclugage, 1980). The last one was observed transiently on the 3rd day of EG, in addition to the decrease in the *Dspp* gene expression in the same period. This condition may explained by Anstendig and Kronman (1972) hypothesis, in which the vascular effects caused by RME have a direct impact on the odontoblasts layer of teeth with complete rhizogenesis.

One of the most common conditions of mineralized tissue deposition is the localized production of reactionary dentin in the coronary or root portion of the tooth in response to orthodontic treatment (Luukko *et al.*, 2011). Although there were no histological changes in dentin, such as the formation of reactionary dentin, presence of nucleated dentin tubules or thickening of the dentin layer, there was an increase in *Dspp* gene expression in dental pulps submitted to RME on the 7th and 14th day of the EG. Because it is a gene responsible for mineralization and maturation of the organic matrix of dentin, suggesting during the time that there is a greater mineral deposition on the dentin tissue. This situation is a favorable long-term factor for evolution of the clinical condition of pulpal calcification, favoring the reactionary dentin formation (Seltzer e Bender, 1984).

Pulpal calcifications develop over time through mineral deposition on pre-existing micro-environments, most commonly in the coronary portion (Ravanshad *et al.*, 2015), without differences in the location that could be indicative of distinguishing the specific site of the forces insertion (Nixon *et al.*, 1993). Causes are strongly related to aggressions of the dentin-pulp complex (Luukko *et al.*, 2011), mainly to traumas (physical factor), and are usually explained as a vital pulp reaction (McCabe e Dummer, 2012). Baratieri *et al.* (2013) evaluated the dimensions of the pulp chamber of the maxillary first molars, supporting teeth for maxillary disjunction, after 1 year of RME, and found through tomography that this procedure does not induce calcification and does not even interfere with the dimensions of the pulp chamber.

Literature (Delivanis e Sauer, 1982; McCabe e Dummer, 2012) presents variable data regarding the period of occurrence of the pulp calcification forms. There are reports of clinical cases detecting this condition early after months of injury (Andreasen, 1970; Torneck e Torabinejad, 1997), or even later after years (Jacobsen e Kerekes, 1977; Robertson *et al.*, 1996), prevailing the idea that a longer evaluation period would be necessary in this experiment.

Studies have shown that the forces employed in orthodontic movements do not cause pulp degeneration (Anstendig e Kronman, 1972; Ramazanzadeh *et al.*, 2009). In this study, the occurrence of reactionary dentin, pulp nodules, diffuse calcifications, calcium metamorphosis, necrosis, or signs of early aging of the pulp tissue, such as areas of extracellular matrix hyalinization and fibrosis were not identified. These results reaffirm that the trauma condition induced by RME to pulp tissue was not able to promote degenerative changes during the 21th day analysis period.

Current study did not show a direct relationship between the application of orthodontic forces and the presence of dentinary alterations or forms of pulp calcification. However, this study has methodological limitations, such as the experimental model, techniques employed, and especially the time of analysis, and can not extrapolate the results directly obtained for clinical treatments in humans. It is extremely important that the orthodontist watch clinically and radiographically the orthodontic movement, and carefully evaluate the pulp condition of the involved teeth. Minimizing errors with the prudent execution of the technique adds to a successful treatment, providing a therapy without compromising the vitality of the pulp tissue, ensuring aesthetic and even functional longevity of orthodontic treatment.

CONCLUSION

Considering 21 days of treatment, RME provided an increase of volume density of blood vessels and transient changes in the odontoblasts layer, also the presence of inflammatory cells up to 14 days. This orthodontic procedure triggered vascular and inflammatory alterations in the pulp tissue susceptible of remodeling, highlighting the capacity of tissue regeneration considering the magnitude of the trauma.

REFERENCES

- ANDREASEN, F. M. et al. Occurrence of pulp canal obliteration after luxation injuries in the permanent dentition. **Endod Dent Traumatol**, v. 3, n. 3, p. 103-15, Jun 1987.
- ANDREASEN, J. O. Etiology and pathogenesis of traumatic dental injuries. A clinical study of 1,298 cases. **Scand J Dent Res**, v. 78, n. 4, p. 329-42, 1970.
- ANSTENDIG, H. S.; KRONMAN, J. H. A histologic study of pulpal reaction to orthodontic tooth movement in dogs. **Angle Orthod**, v. 42, n. 1, p. 50-5, Jan 1972.

- ARNEZ, M. F. M. et al. RANK/RANKL/OPG Expression in Rapid Maxillary Expansion. **Braz Dent J**, v. 28, n. 3, p. 296-300, 2017 May-Jun 2017.
- BABACAN, H.; DORUK, C.; BICAKCI, A. A. Pulpal blood flow changes due to rapid maxillary expansion. **Angle Orthod**, v. 80, n. 6, p. 1136-40, Nov 2010.
- BARATIERI, C. et al. Changes of pulp-chamber dimensions 1 year after rapid maxillary expansion. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 143, n. 4, p. 471-8, Apr 2013.
- BHASKAR, S. N. **Histologia e Embriologia Oral de Orban**. 10 edição. São Paulo, Brasil: Artes Médicas, 1989. 501p.
- CAVIEDES-BUCHELI, J. et al. Effect of experimentally induced occlusal trauma on substance p expression in human dental pulp and periodontal ligament. **J Endod**, v. 37, n. 5, p. 627-30, May 2011.
- CAVIEDES-BUCHELI, J. et al. Angiogenic mechanisms of human dental pulp and their relationship with substance P expression in response to occlusal trauma. **Int Endod J**, v. 50, n. 4, p. 339-351, Apr 2017.
- CAVIEDES-BUCHELI, J. et al. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. **J Endod**, v. 34, n. 7, p. 773-88, Jul 2008.
- DAVIDOVITCH, Z. Tooth movement. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 2, n. 4, p. 411-50, 1991.
- DE CLEEN, M. Obliteration of pulp canal space after concussion and subluxation: endodontic considerations. **Quintessence Int**, v. 33, n. 9, p. 661-9, Oct 2002.
- DELIVANIS, H. P.; SAUER, G. J. Incidence of canal calcification in the orthodontic patient. **Am J Orthod**, v. 82, n. 1, p. 58-61, Jul 1982.
- DVORAK, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **J Clin Oncol**, v. 20, n. 21, p. 4368-80, Nov 2002.
- FANG, P. A. et al. Ultrastructural organization of dentin in mice lacking dentin sialo-phosphoprotein. **Connect Tissue Res**, v. 55 Suppl 1, p. 92-6, Aug 2014.
- FOUAD, A. F. Mediadores moleculares da inflamação pulpar. In: HARGREAVES, K. M. e GOODIS, H. E. (Ed.). **Polpa Dentária de Seltzer e Bender**: Quintessence Editora Ltda, 2009. cap. 11, p.247-279.
- GOLDBERG, M.; NJEH, A.; UZUNOGLU, E. Is Pulp Inflammation a Prerequisite for Pulp Healing and Regeneration? **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 347649, 2015.
- GUEVARA, M. J.; MCCLUGAGE, S. G. Effects of intrusive forces upon the microvasculature of the dental pulp. **Angle Orthod**, v. 50, n. 2, p. 129-34, Apr 1980.
- GÜVEN, G. et al. Co-expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in inflamed human pulp: an immunohistochemical study. **J Endod**, v. 33, n. 1, p. 18-20, Jan 2007.
- HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 5, p. 1011-27, Feb 2005.
- HOLLAND, R. et al. Influence of the type of vehicle and limit of obturation on apical and periapical tissue response in dogs' teeth after root canal filling with mineral trioxide aggregate. **J Endod**, v. 33, n. 6, p. 693-7, Jun 2007.

JACOBSEN, I.; KEREKES, K. Long-term prognosis of traumatized permanent anterior teeth showing calcifying processes in the pulp cavity. **Scand J Dent Res**, v. 85, n. 7, p. 588-98, Nov 1977.

KAYHAN, F.; KÜÇÜKKELEŞ, N.; DEMIREL, D. A histologic and histomorphometric evaluation of pulpal reactions following rapid palatal expansion. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 117, n. 4, p. 465-73, Apr 2000.

KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 129, n. 4, p. 469.e1-32, Apr 2006.

KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. **Biological mechanisms of tooth movement**. 2nd edition. 2015. 312 pages.

LIVAK, J. K.; SCHMITTGEN, T. D. **Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method**. *Methods - Applied Biosystems: Elsevier Science*. 25: 402-408 p. 2001.

LUUKKO, K. et al. Estrutura e Funções do Complexo Dentino-Pulpar. In: (Ed.). **COHEN - Caminhos da Polpa**. 10ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p.418-463.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Métodos Quantitativos em Morfologia**. Rio de Janeiro, RJ: Editora da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (EdUERJ): 131 p. 1995.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **What is the interest of normal and pathological morphological research to be quantitative? The example of the stereology**. *Morphol. Sci.* 16: 131-139 p. 1999.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc**, v. 75, n. 4, p. 469-86, Dec 2003.

MASSARO, C. A. S. et al. Analysis of the dentin-pulp complex in teeth submitted to orthodontic movement in rats. **J Appl Oral Sci**, v. 17 Suppl, p. 35-42, 2009. ISSN 1678-7765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21499653> >.

MCCABE, P. S.; DUMMER, P. M. Pulp canal obliteration: an endodontic diagnosis and treatment challenge. **Int Endod J**, v. 45, n. 2, p. 177-97, Feb 2012.

MOSTAFA, Y. A.; ISKANDER, K. G.; EL-MANGOURY, N. H. Iatrogenic pulpal reactions to orthodontic extrusion. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 99, n. 1, p. 30-4, Jan 1991.

NANCI, A. **Ten Cate - Histologia Oral**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

NIXON, C. E. et al. Histomorphometric study of dental pulp during orthodontic tooth movement. **J Endod**, v. 19, n. 1, p. 13-6, Jan 1993.

ONG, S. C. et al. The novel use of three-dimensional surface models to quantify and visualise the immediate changes of the mid-facial skeleton following rapid maxillary expansion. **Surgeon**, v. 13, n. 3, p. 132-8, Jun 2015.

PIATTELLI, A.; TRISI, P. Pulp obliteration: a histological study. **J Endod**, v. 19, n. 5, p. 252-4, May 1993.

RAMAZANZADEH, B. A. et al. Histological changes in human dental pulp following application of intrusive and extrusive orthodontic forces. **J Oral Sci**, v. 51, n. 1, p. 109-15, Mar 2009.

RAVANSHAD, S.; KHAYAT, S.; FREIDONPOUR, N. The Prevalence of Pulp stones in Adult Patients of Shiraz Dental School, a Radiographic Assessment. **J Dent (Shiraz)**, v. 16, n. 4, p. 356-61, Dec 2015.

ROBERTSON, A. et al. Incidence of pulp necrosis subsequent to pulp canal obliteration from trauma of permanent incisors. **J Endod**, v. 22, n. 10, p. 557-60, Oct 1996.

ROTSTEIN, I.; ENGEL, G. Conservative management of a combined endodontic-orthodontic lesion. **Endod Dent Traumatol**, v. 7, n. 6, p. 266-9, Dec 1991.

ROUZER, C. A.; MARNETT, L. J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. **J Lipid Res**, v. 50 Suppl, p. S29-34, Apr 2009.

SAWADA, M.; SHIMIZU, N. Stimulation of bone formation in the expanding mid-palatal suture by transforming growth factor-beta 1 in the rat. **Eur J Orthod**, v. 18, n. 2, p. 169-79, Apr 1996.

SELTZER, S.; BENDER, I. B. **The dental pulp: biologic considerations in dental procedures**. 3rd. Philadelphia: 1984.

SUZUKI, S. et al. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. **Matrix Biol**, v. 28, n. 4, p. 221-9, May 2009.

TAŞPINAR, F. et al. The histopathological investigation of pulpal tissue following heavy orthopaedic forces produced by rapid maxillary expansion. **J Int Med Res**, v. 31, n. 3, p. 197-201, 2003 May-Jun 2003.

TORNECK, C. D.; TORABINEJAD, M. Biologia da polpa e tecidos da região periapical. In: WALTON, R. e TORABINEJAD, M. (Ed.). **Princípios e Prática em Endodontia**. 2º. Santos: Editora São Paulo, 1997. cap. 2, p.6-28.

VON BÖHL, M. et al. Pulpal reactions to orthodontic force application in humans: a systematic review. **J Endod**, v. 38, n. 11, p. 1463-9, Nov 2012.

WOLFSON, E. M.; SELTZER, S. Reaction of rat connective tissue to some gutta-percha formulations. **J Endod**, v. 1, n. 12, p. 395-402, Dec 1975.

YAMAGUCHI, M.; KASAI, K. **The effects of orthodontic mechanics on the dental pulp**. Seminars in Orthodontics: Elsevier Inc. 13: 272-280 p. 2007.

Table 1 Number of animals with pulp phenomena microscopically observed in GC and EG (n=5 for each group).

PHENOMENA	CONTROL GROUP				EXPERIMENTAL GROUP			
	3 days	7 days	14 days	21 days	3 days	7 days	14 days	21 days
I) Cellularity pattern								
a) Inflammatory infiltrate	0	0	0	0	5	5	4	2
b) Reduced cellularity	0	0	0	0	0	0	0	0
c) Increased Fibrosis	0	0	0	0	0	0	0	0
II) Dystrophic alterations								
a) Pulpal Hyalinization	0	0	0	0	0	0	0	0
b) Pulpal nodules	0	0	0	0	0	0	0	0
c) Difuse calcification	0	0	0	0	0	0	0	0
d) Calcic metamorphosis	0	0	0	0	0	0	0	0
e) Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0
III) Hemodynamic changes								
a) Vascular congestion	0	0	0	0	5	5	3	1
b) Bleeding	0	0	0	0	5	4	3	1
c) Thrombosis	0	0	0	0	0	0	0	0
IV) Dentinary alterations								
a) Reactionary dentin	0	0	0	0	0	0	0	0
b) Nuclei tubules	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 Mean and standard deviation of blood vessel density (Vv) for GC and GE periods.

Period	3 days		7 days		14 days		21 days	
Group	CG	EG	CG	EG	CG	EG	CG	EG
Vv (%)	6.40±0.89	13±1.29**	6.20±1.30	9.70±1.25**	6.40±0.89	8.57±0.97**	6.20±0.83	7.71±0.75**

** Statistical significance in relation to the control group (p<0.01).

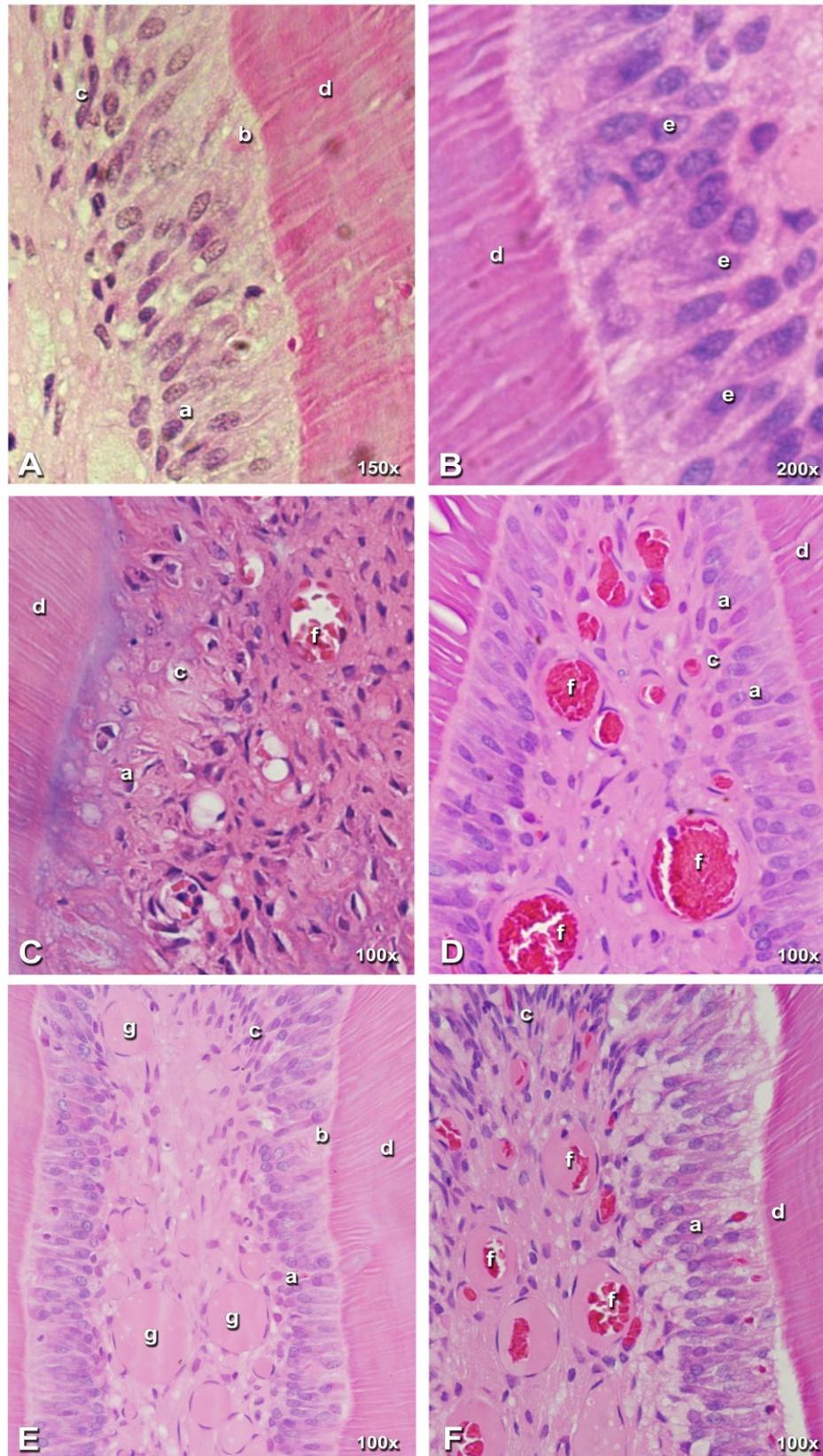


Figure 1 Photomicrographs from dental pulp tissue of the Control group (A) and Experimental group (B, C, D, E, F). Odontoblasts layer (a), Weil-free zone of cells (b), cell-rich zone (c), dentin (d), hypertrophied odontoblasts (e), hyperemic and dilated blood vessels (f), dilated blood vessels (g).

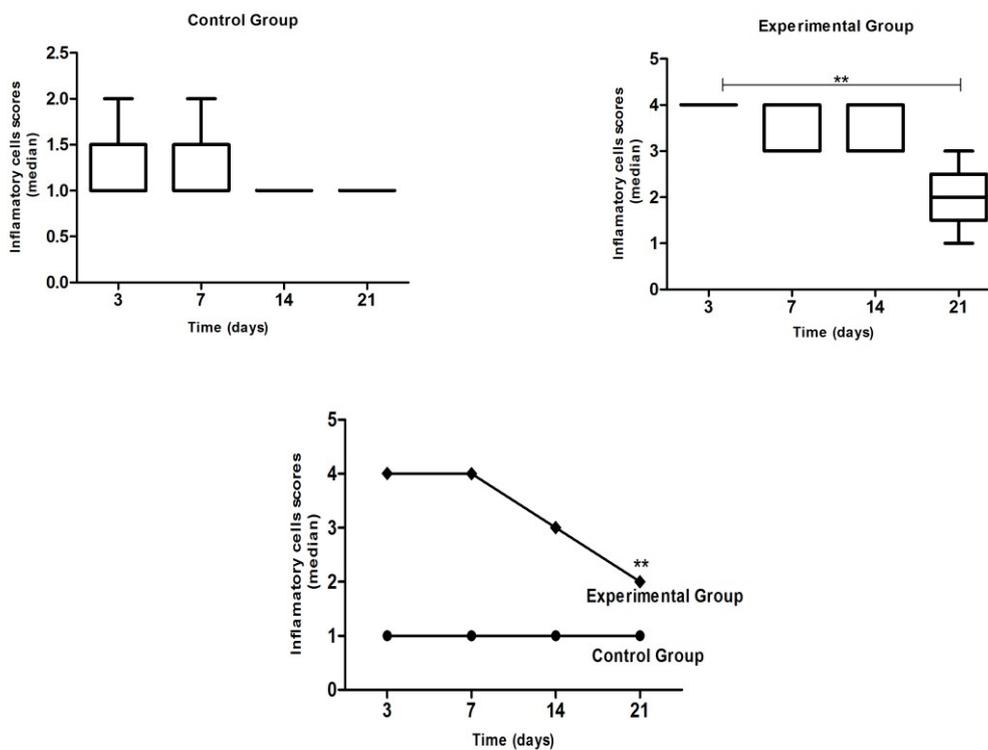


Figure 2 Expression of the median, interquartile range, maximum and minimum values of the number of inflammatory cell scores during 21 days ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis, Dunn's test, $**p < 0.01$).

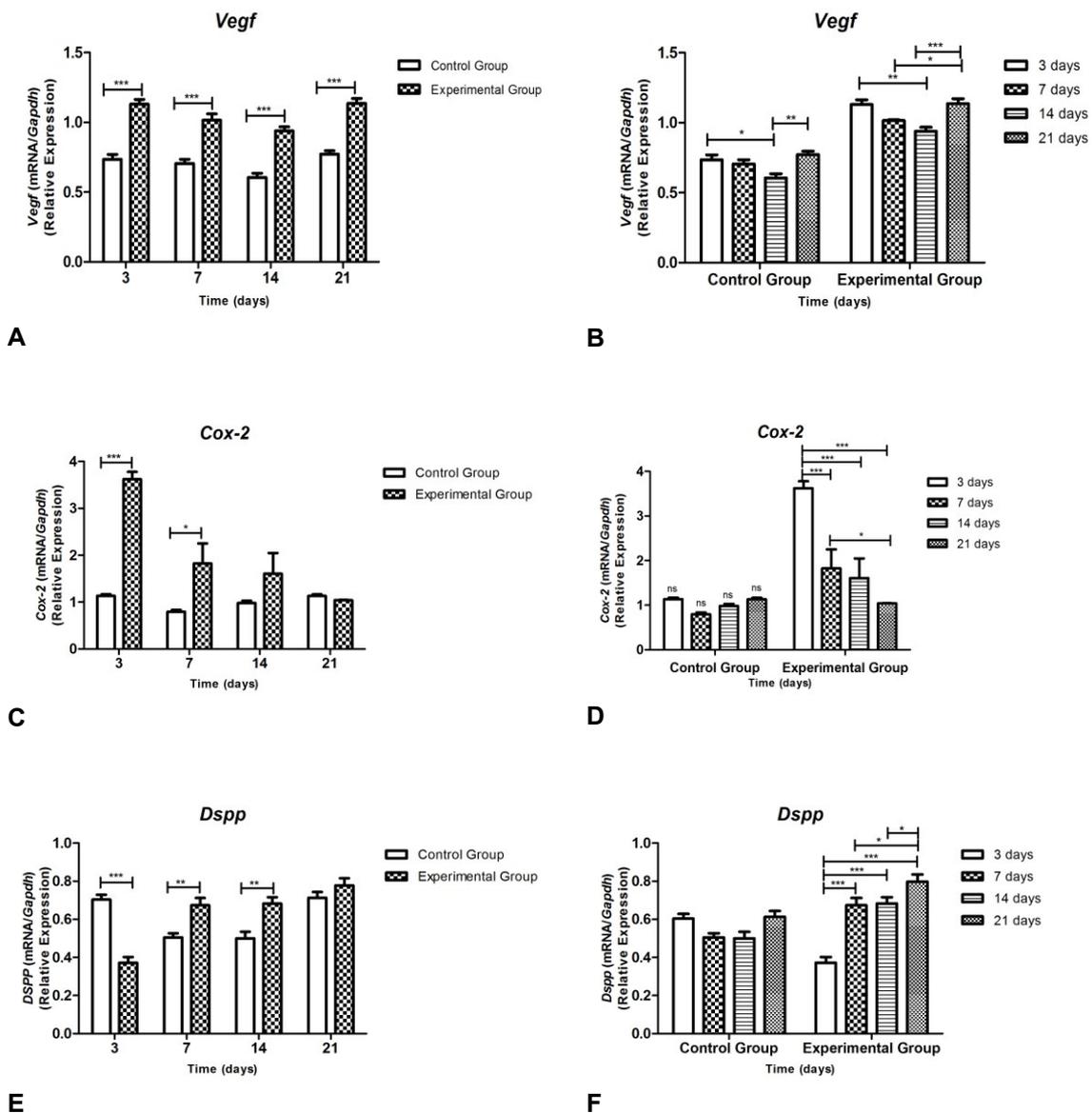


Figure 3 Expression of mRNA during 21 days of experiment. Comparative expression between CG and EG in the experimental periods to *Vegf* (A), *Cox-2* (C) e *Dspp* (E). Comparative expression between experimental periods of CG and EG to *Vegf* (B), *Cox-2* (D) e *Dspp* (F). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns=non-significant.

5 DISCUSSÃO

A maioria dos estudos descreve as reações na sutura palatina mediana e no periodonto dos dentes de ancoragem, e há poucos relatos em relação às alterações pulpares quando envolve forças de grande magnitude (Kayhan *et al.*, 2000; Taşpınar, Akgül, *et al.*, 2003; Von Böhl *et al.*, 2012; Baratieri *et al.*, 2013). O conhecimento e o entendimento sobre as alterações ocorridas na polpa dos dentes de ancoragem após a ERM, bem como o processo de remodelação do tecido pulpar, ainda é escasso e não esclarecido.

Os resultados histológicos deste trabalho apontam aumento da presença de células e sinais de inflamação no tecido pulpar até os 14 dias após a ERM, e maior densidade volumétrica de perfis de vasos sanguíneos em todos os períodos do GE, com tendência de retornar aos valores do GC aos 21 dias. A associação destes eventos demonstra que a ERM desencadeou uma resposta inflamatória no tecido pulpar e aumento da vascularização em todos os períodos analisados. Güven *et al.* (2007) e Caviedes-Bucheli *et al.* (2011) descrevem esse evento como uma condição temporária de inflamação neurogênica, desencadeada pelo estímulo mecânico às fibras nervosas sensoriais do tecido pulpar e do periodonto, com aumento transitório da permeabilidade vascular. Alguns autores (Nixon *et al.*, 1993; Kayhan *et al.*, 2000; Taşpınar, Akgül, *et al.*, 2003; Yamaguchi e Kasai, 2007; Babacan *et al.*, 2010) explicam a ocorrência da dinâmica de homeostasia frente às forças ortodônticas, revelando uma fase inicial de aumento do fluxo

sanguíneo no tecido pulpar e alterações celulares. Estes fenômenos promovem reorganização neurovascular no tecido, e posteriormente tendência de retomar as condições de normalidade (Derringer *et al.*, 1996; Polverini, 2002; Babacan *et al.*, 2010). É possível observar compatibilidade dos resultados deste estudo com os fatos descritos na literatura. A intensidade do processo inflamatório e a vascularização do GE reduziram significativamente aos 21 dias, período no qual grande parte da carga de força foi dissipada. No entanto, para uma extrapolação clínica, tem-se que considerar fatores como idade do indivíduo, direção de força e o grupo ao qual o dente pertence (Barwick e Ramsay, 1996).

A produção de prostanóides pela COX-2 estimula a produção de VEGF, acarretando inicialmente aumento do aporte sanguíneo, de células inflamatórias, nutrientes e oxigênio para o local da inflamação, e conseqüentemente, aumento da vascularização no tecido (Güven *et al.*, 2007). A presença de VEGF e de COX-2 nos processos inflamatórios tem sido altamente correlacionada, uma vez que a liberação de VEGF ocorre através de uma via dependente de COX-2 (Dvorak, Brown, *et al.*, 1995; Polverini, 1995; Dvorak, 2002; Hicklin e Ellis, 2005; Güven *et al.*, 2007). No presente estudo, nota-se a correlação dos efeitos inflamatórios e vasculares. O aumento substancial da expressão de RNAm de *Cox-2* nos períodos iniciais após a ERM, confirmam os achados histológicos, com aumento de células inflamatórias e sinais da inflamação no tecido pulpar, como vasodilatação, edema, hiperemia e hemorragia. O aumento da densidade volumétrica de perfis de vasos sanguíneos (Vv) e da expressão de *Vegf* nos mesmos períodos experimentais reafirmam a inter-relação entre a expressão de *Cox-2* e de *Vegf*, em um momento cuja força ainda não foi dissipada.

A transdução das forças mecânicas da ERM para a matriz extracelular induz modificações na membrana celular, citoesqueleto, síntese de proteínas da matriz nuclear e, conseqüentemente, alterações no padrão de expressão gênica (Krishnan e Davidovitch, 2006). Esta, por sua vez, modula-se através do controle da produção de RNAs ou pela capacidade de alterar os níveis proteicos (Alberts *et al.*, 2002). Este fenômeno pode ser observado entre a expressão de *Vegf* e *Cox-2*, e seus reflexos no tecido pulpar. A intensidade decrescente de células inflamatórias no decorrer dos períodos do GE se confirmam com o perfil da expressão gênica de RNAm de *Cox-2* no GE, nos mesmos períodos. Da mesma forma, observou-se aumento da expressão de RNAm de *Vegf* em todos os períodos avaliados do GE, e o conseqüente aumento da densidade de vasos sanguíneos (Vv) no tecido pulpar. Entretanto, deve-se ressaltar que os processos de regulação gênica e tradução proteica podem não ser necessariamente o reflexo um do outro, visto que os dados histológicos reproduzem a execução de uma cascata de eventos sinalizados pela atividade gênica, expressos no tecido no decorrer do tempo (Alberts *et al.*, 2002).

A severidade da resposta inflamatória ocasionada pelo agente agressor exerce grande influência na extensão da injúria pulpar (Rotstein e Engel, 1991; Caviedes-Bucheli *et al.*, 2008). A produção de exsudato e hiperemia gerados no processo inflamatório podem acarretar um acúmulo excessivo de fluido tissular, possibilitando o colapso vascular da polpa (Seltzer e Bender, 1984; Bhaskar, 1989). E por estar confinada no interior de um arcabouço rígido de dentina e esmalte, pode prolongar a duração e agravar o processo inflamatório, com injúrias extensas e sequelas (Orban, 1941; Mjör *et al.*, 1991; Nanci, 2013). Esta situação não foi caracterizada no presente estudo, em razão de que aos 21 dias da ERM o

processo inflamatório se mostrou parcialmente resolutivo. Houve redução significativa do infiltrado de células inflamatórias e menor frequência de áreas hemorrágicas, de hiperemia e vasodilatação, quando comparado com os períodos iniciais de 3 e 7 dias. É pertinente afirmar que por se tratar de tecido conjuntivo, a polpa possui elevada capacidade reparadora, com excelentes propriedades regenerativas e de vascularização (Seltzer e Bender, 1984; Bhaskar, 1989), restabelecendo-se diante do trauma gerado pela ERM. Para isto, deve haver condições favoráveis, e que esse tecido não tenha sofrido injúrias prévias (Rotstein e Engel, 1991).

No entanto, a intensidade do agente agressor pode ser fator crítico para o reparo pulpar. Sabe-se que o comprometimento nervoso e vascular, a citar a falta de circulação colateral da polpa, é o principal fator etiológico para a degeneração pulpar durante a aplicação de forças externas (Stenvik e Mjör, 1970; Guevara e Mcclugage, 1980). O uso de forças leves e intermitentes, e o tempo adequado para a recuperação reduzem danos aos tecidos pulpares, embora ainda possam exercer algum efeito deletério à camada de odontoblastos (Mostafa *et al.*, 1991). Em contrapartida, forças intensas podem resultar em degeneração, necrose ou hipertrofia de odontoblastos durante a movimentação dentária ortodôntica (Skillen e Reitan 1940; Oppenheim, 1942; Stenvik e Mjör, 1970; Tschamer, 1974; Guevara e Mcclugage, 1980). Este último foi observado transitoriamente no 3º dia do GE, além da diminuição da expressão gênica de *Dspp* no mesmo período, possivelmente devido a hipótese de Anstendig e Kronman (1972), em que os efeitos vasculares ocasionados pela ERM exercem impacto direto na camada de odontoblastos de dentes com rizogênese completa.

Entre as formas mais comuns de deposição de tecido mineralizado, pode-se destacar a produção localizada de dentina reacional, na porção coronária ou radicular do dente, em resposta ao tratamento ortodôntico (Delivanis e Sauer, 1982; Moleri *et al.*, 2010; Luukko *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2012). Embora nos resultados do GE não tenham sido constatadas alterações histológicas em dentina, como a formação de dentina reacional, presença de túbulos dentinários nucleados ou ainda o espessamento da camada de pré-dentina, houve um aumento na expressão do gene *Dspp* nas polpas dentárias submetidas à ERM no 7º e 14º dia do GE. Por se tratar de um gene responsável pela mineralização e maturação da matriz orgânica da dentina, torna-se sugestivo, no decorrer do tempo, haver maior deposição mineral sobre o tecido dentinário. Esta situação atua como fator favorável, a longo prazo, para a evolução da condição clínica de calcificação pulpar (Smyth, 1950; Seltzer e Bender, 1984; Piattelli e Trisi, 1993), favorecendo a formação de dentina reacional.

As calcificações pulpares se desenvolvem ao longo do tempo por meio da deposição mineral sobre micro-ambientes pré-existentes, mais comumente na porção coronária (Ravanshad *et al.*, 2015), e podem ser identificadas por meio de radiografias (Moss-Salentijn e Hendricks-Klyvert, 1988). Manifestam-se desde a deformação da anatomia interna da cavidade pulpar à completa obliteração do espaço pulpar (McCabe e Dummer, 2012; Carvalho *et al.*, 2013), sem diferenças em relação à localização que pudesse ser indicativa de distinguir o local específico da aplicação da força (Nixon *et al.*, 1993). As causas estão fortemente relacionadas às agressões do complexo dentino-pulpar (Luukko *et al.*, 2011), principalmente aos traumas (fator físico), e geralmente são explicadas como uma reação da polpa vital (Robertson *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2012; McCabe e

Dummer, 2012). Baratieri *et al.* (2013) avaliaram as dimensões da câmara pulpar dos primeiros molares superiores, dentes suporte para a disjunção maxilar, após 1 ano da realização da ERM, e constataram através de tomografias que este procedimento não induz à calcificação e nem mesmo interfere nas dimensões da câmara pulpar.

A literatura (Delivanis e Sauer, 1982; McCabe e Dummer, 2012) apresenta dados variáveis relativos ao período de ocorrência das formas de calcificação pulpar. Há relatos de casos clínicos detectando esta condição precocemente, após 3 meses da injúria (Andreasen, 1970; Rock e Grundy, 1981; Torneck e Torabinejad, 1997), ou até mesmo em períodos mais tardios, após 16 anos (Jacobsen e Kerekes, 1977; Robertson *et al.*, 1996), prevalecendo a idéia de que seria necessário um período de avaliação mais extenso neste estudo experimental.

Estudos apontam que as forças empregadas nas movimentações ortodônticas não ocasionam degeneração da polpa (Butcher e Taylor, 1952; Mjör e Stenvik, 1969; Anstendig e Kronman, 1972; Mjör *et al.*, 1991; Santamaria *et al.*, 2006; Santamaria *et al.*, 2007; Ramazanzadeh *et al.*, 2009). Neste estudo, não foi identificado no GE a ocorrência de dentina reacional, nódulos pulpares, calcificações difusas, metamorfose cálcica da polpa, necrose, ou ainda sinais de envelhecimento precoce do tecido pulpar, como áreas de hialinização da matriz extracelular e de fibrose. Estes resultados reafirmam que a condição de trauma induzido pela ERM ao tecido pulpar não foi capaz de promover alterações degenerativas durante o período de 21 dias de análise.

No atual estudo, não foi evidenciado uma relação direta entre a aplicação de forças ortodônticas e a presença de alterações dentinárias ou formas de

calcificação pulpar. Todavia, este estudo apresenta limitações metodológicas, como o modelo experimental, técnicas empregadas, e principalmente o tempo de análise, não podendo extrapolar os resultados obtidos diretamente para os tratamentos clínicos em humanos. Contudo, é de suma importância que o ortodontista acompanhe clínica e radiograficamente a movimentação ortodôntica, e avalie criteriosamente a condição pulpar dos dentes envolvidos. Minimizar erros com a execução prudente da técnica somam para um tratamento de sucesso, proporcionando uma terapia sem comprometer a vitalidade do tecido pulpar, garantindo longevidade estética e até mesmo funcional do tratamento ortodôntico.

6 CONCLUSÕES

Após a expansão rápida da maxila, no período avaliado de até 21 dias, pode-se concluir que houve:

6.1 alterações vasculares, inflamatórias, e na camada de odontoblastos transitórias, possibilitando a remodelação do tecido pulpar dos dentes de ancoragem;

6.2 aumento da densidade de volume de vasos sanguíneos em todos os períodos analisados, e aumento do número de células inflamatórias nos períodos de 3, 7 e 14 dias, e,

6.3 aumento significativo da expressão gênica de *Vegf* em todos os períodos experimentais, sendo o aumento de *Cox-2* apenas nos períodos de 3 e 7 dias, e o de *Dspp* no 7º e 14º dias.

7 RECOMENDAÇÕES

Com base nos dados disponíveis na literatura e nos resultados obtidos com o presente estudo, futuras pesquisas devem avaliar, a longo prazo, se a ERM pode induzir a formação de dentina reacional ou de formas de calcificação pulpar. Análises complementares, com uso de técnicas de quantificação proteica e imunolocalização podem ser válidas para a elucidação do mecanismo e identificação precoce da ocorrência das calcificações pulpares.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4º edição. New York: Garland Science, 2002. ISBN 0-8153-3577-6.

AMIR, F. A.; GUTMANN, J. L.; WITHERSPOON, D. E. Calcific metamorphosis: a challenge in endodontic diagnosis and treatment. **Quintessence Int**, v. 32, n. 6, p. 447-55, Jun 2001. ISSN 0033-6572. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11491624> >.

ANDREASEN, F. M. Histological and bacteriological study of pulps extirpated after luxation injuries. **Endod Dent Traumatol**, v. 4, n. 4, p. 170-81, Aug 1988. ISSN 0109-2502. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3267527> >.

ANDREASEN, F. M. Pulpal healing after luxation injuries and root fracture in the permanent dentition. **Endod Dent Traumatol**, v. 5, n. 3, p. 111-31, Jun 1989. ISSN 0109-2502. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2699588> >.

ANDREASEN, F. M. Pulpal healing following acute dental trauma: clinical and radiographic review. **Pract Proced Aesthet Dent**, v. 13, n. 4, p. 315-22; quiz 324, May 2001. ISSN 1534-6846. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11402773> >.

ANDREASEN, F. M. et al. Occurrence of pulp canal obliteration after luxation injuries in the permanent dentition. **Endod Dent Traumatol**, v. 3, n. 3, p. 103-15, Jun 1987. ISSN 0109-2502. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3476298> >.

ANDREASEN, J. O. Etiology and pathogenesis of traumatic dental injuries. A clinical study of 1,298 cases. **Scand J Dent Res**, v. 78, n. 4, p. 329-42, 1970. ISSN 0029-845X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4394635> >.

ANSTENDIG, H. S.; KRONMAN, J. H. A histologic study of pulpal reaction to orthodontic tooth movement in dogs. **Angle Orthod**, v. 42, n. 1, p. 50-5, Jan 1972. ISSN 0003-3219. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4500564> >.

ARNEZ, M. F. M. et al. RANK/RANKL/OPG Expression in Rapid Maxillary Expansion. **Braz Dent J**, v. 28, n. 3, p. 296-300, 2017 May-Jun 2017. ISSN 1806-4760. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29297549> >.

ARTESE, L. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in healthy and inflamed human dental pulps. **J Endod**, v. 28, n. 1, p. 20-3, Jan 2002. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11806643> >.

BABACAN, H.; DORUK, C.; BICAKCI, A. A. Pulpal blood flow changes due to rapid maxillary expansion. **Angle Orthod**, v. 80, n. 6, p. 1136-40, Nov 2010. ISSN 1945-7103. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20677966> >.

BACCETTI, T.; FRANCHI, L.; MCNAMARA, J. A. Treatment and posttreatment craniofacial changes after rapid maxillary expansion and facemask therapy. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 118, n. 4, p. 404-13, Oct 2000. ISSN 0889-5406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11029736> >.

BARATIERI, C. et al. Changes of pulp-chamber dimensions 1 year after rapid maxillary expansion. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 143, n. 4, p. 471-8, Apr 2013. ISSN 1097-6752. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23561407> >.

BARWICK, P. J.; RAMSAY, D. S. Effect of brief intrusive force on human pulpal blood flow. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 110, n. 3, p. 273-9, Sep 1996. ISSN 0889-5406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8814028> >.

BHASKAR, S. N. **Histologia e Embriologia Oral de** Luptook. 10 edição. São Paulo, Brasil: Artes Médicas, 1989. 501.

BISTER, D.; MEIKLE, M. C. Re-examination of 'Einige Beiträge zur Theorie der Zahnregulierung' (Some contributions to the theory of the regulation of teeth) published in 1904-1905 by Carl Sandstedt. **Eur J Orthod**, v. 35, n. 2, p. 160-8, Apr 2013. ISSN 1460-2210. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22450601> >.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol**, v. 25, n. 2, p. 169-93, Oct 2000. ISSN 0952-5041. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11013345> >.

BUTCHER, E. O.; TAYLOR, A. C. The vascularity of the incisor pulp of the monkey and its alteration by tooth retraction. **J Dent Res**, v. 31, n. 2, p. 239-47, Apr 1952. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14917839> >.

CARVALHO, A. C. et al. Impact of malocclusion on oral health-related quality of life among Brazilian preschool children: a population-based study. **Braz Dent J**, v. 24, n. 6, p. 655-61, 2013 Nov-Dec 2013. ISSN 1806-4760. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24474365> >.

CAVIEDES-BUCHELI, J. et al. The effect of orthodontic forces on calcitonin gene-related peptide expression in human dental pulp. **J Endod**, v. 37, n. 7, p. 934-7, Jul 2011. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21689547> >.

CAVIEDES-BUCHELI, J. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. **J Endod**, v. 34, n. 7, p. 773-88, Jul 2008. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18570980> >.

CHARNOCK-JONES, D. S.; HE, Y.; SMITH, S. K. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor (VEGF) in reproduction. In: FAN, T. D. e KOHN, E. C. (Ed.). **The New Angiotherapy**. Totowa, NJ: Humana Press, 2002. cap. 8, p.115-28. ISBN 978-1-59259-126-8.

COHEN, S.; SCHWARTZ, S. Endodontic complications and the law. **J Endod**, v. 13, n. 4, p. 191-7, Apr 1987. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3471843> >.

DA SILVA, A. P. et al. Effect of low-level laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic cells. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 4, p. 777-83, Jul 2012. ISSN 1435-604X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21842225> >.

DAVIDOVITCH, Z. Tooth movement. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 2, n. 4, p. 411-50, 1991. ISSN 1045-4411. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1742417> >.

DE CLEEN, M. Obliteration of pulp canal space after concussion and subluxation: endodontic considerations. **Quintessence Int**, v. 33, n. 9, p. 661-9, Oct 2002. ISSN 0033-6572. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12666890> >.

DELIVANIS, H. P.; SAUER, G. J. Incidence of canal calcification in the orthodontic patient. **Am J Orthod**, v. 82, n. 1, p. 58-61, Jul 1982. ISSN 0002-9416. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6961778> >.

DERRINGER, K. A.; JAGGERS, D. C.; LINDEN, R. W. Angiogenesis in human dental pulp following orthodontic tooth movement. **J Dent Res**, v. 75, n. 10, p. 1761-6, Oct 1996. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8955671> >.

DVORAK, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **J Clin Oncol**, v. 20, n. 21, p. 4368-80, Nov 2002. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12409337> >.

DVORAK, H. F. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **Am J Pathol**, v. 146, n. 5, p. 1029-39, May 1995. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7538264> >.

DVORAK, H. F. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 107, n. 1-3, p. 233-5, 1995 May-Jun 1995. ISSN 1018-2438. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7542074> >.

FANG, P. A. et al. Ultrastructural organization of dentin in mice lacking dentin sialophosphoprotein. **Connect Tissue Res**, v. 55 Suppl 1, p. 92-6, Aug 2014. ISSN 1607-8438. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25158189> >.

FERREIRA, D. A. B. et al. Alterações Pulpareas com o Envelhecimento. In: FREGNANI, E. e HIZATUGU, R. **Endodontia: uma Visão Contemporânea**. 1º edição. São Paulo: Santos, 2012. cap. 17, p.203-2011.

FLEIGE, S. et al. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. **Biotechnol Lett**, v. 28, n. 19, p. 1601-13, Oct 2006. ISSN 0141-5492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16900335> >.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J Biol Chem**, v. 267, n. 16, p. 10931-4, Jun 1992. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1375931> >.

FOUAD, A. F. Mediadores moleculares da inflamação pulpar. In: HARGREAVES, K. M. e GOODIS, H. E. **Polpa Dentária de Seltzer e Bender**: Quintessence Editora Ltda, 2009. cap. 11, p.247-279. ISBN 978-85-87425-71-3.

GOLDBERG, M.; NJEH, A.; UZUNOGLU, E. Is Pulp Inflammation a Prerequisite for Pulp Healing and Regeneration? **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 347649, 2015. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26538825> >.

GUEVARA, M. J.; MCCLUGAGE, S. G. Effects of intrusive forces upon the microvasculature of the dental pulp. **Angle Orthod**, v. 50, n. 2, p. 129-34, Apr 1980. ISSN 0003-3219. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6929168> >.

GÜVEN, G. et al. Co-expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in inflamed human pulp: an immunohistochemical study. **J Endod**, v. 33, n. 1, p. 18-20, Jan 2007. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17185121> >.

HAAS, A. J. Long-term posttreatment evaluation of rapid palatal expansion. **Angle Orthod**, v. 50, n. 3, p. 189-217, Jul 1980. ISSN 0003-3219. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6996533> >.

HARGREAVES, K.; BERMAN, L. **Cohen's Pathways of the Pulp Expert Consult**. 11th. Elsevier Health Sciences, 2015. 928 ISBN 9780323096355.

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 5, p. 1011-27, Feb 2005. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585754> >.

HINZ, B.; BRUNE, K. Cyclooxygenase-2--10 years later. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 300, n. 2, p. 367-75, Feb 2002. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11805193> >.

HOLLAND, R. et al. Influence of the type of vehicle and limit of obturation on apical and periapical tissue response in dogs' teeth after root canal filling with mineral trioxide aggregate. **J Endod**, v. 33, n. 6, p. 693-7, Jun 2007. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17509408> >.

IÑIGUEZ, M. A. et al. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. **Trends Mol Med**, v. 9, n. 2, p. 73-8, Feb 2003. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615041> >.

JACOBSEN, I.; KEREKES, K. Long-term prognosis of traumatized permanent anterior teeth showing calcifying processes in the pulp cavity. **Scand J Dent Res**, v. 85, n. 7, p. 588-98, Nov 1977. ISSN 0029-845X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/272723> >.

KAYHAN, F.; KÜÇÜKKELEŞ, N.; DEMIREL, D. A histologic and histomorphometric evaluation of pulpal reactions following rapid palatal expansion. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 117, n. 4, p. 465-73, Apr 2000. ISSN 0889-5406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10756273> >.

KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 129, n. 4, p. 469.e1-32, Apr 2006. ISSN 1097-6752. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16627171> >.

KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. **Biological mechanisms of tooth movement**. 2nd edition. 2015. 312 pages ISBN ISBN: 978-1-118-68887-8.

LEAHY, K. M.; KOKI, A. T.; MASFERRER, J. L. Role of cyclooxygenases in angiogenesis. **Curr Med Chem**, v. 7, n. 11, p. 1163-70, Nov 2000. ISSN 0929-8673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11032965> >.

LIVAK, J. K.; SCHMITTGEN, T. D. **Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method**. *Methods - Applied Biosystems*: Elsevier Science. 25: 402-408 p. 2001.

LUUKKO, K. et al. Estrutura e Funções do Complexo Dentino-Pulpar. In: (Ed.). **COHEN - Caminhos da Polpa**. 10ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p.418-463.

MAJIMA, M. et al. Cyclo-oxygenase-2 enhances basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants. **Br J Pharmacol**, v. 130, n. 3, p. 641-9, Jun 2000. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10821793> >.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Métodos Quantitativos em Morfologia**. Rio de Janeiro, RJ: Editora da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (EdUERJ): 131 p. 1995.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Stereology in the normal and pathological morphologic research**. *Biomed Res*. 9: 153-163 p. 1998.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **What is the interest of normal and pathological morphological research to be quantitative? The example of the stereology**. *Morphol. Sci*. 16: 131-139 p. 1999.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc**, v. 75, n. 4, p. 469-86, Dec 2003. ISSN 0001-3765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14605681> >.

MASSARO, C. A. S. et al. Analysis of the dentin-pulp complex in teeth submitted to orthodontic movement in rats. **J Appl Oral Sci**, v. 17 Suppl, p. 35-42, 2009. ISSN 1678-7765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21499653> >.

MCCABE, P. S.; DUMMER, P. M. Pulp canal obliteration: an endodontic diagnosis and treatment challenge. **Int Endod J**, v. 45, n. 2, p. 177-97, Feb 2012. ISSN 1365-2591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21999441> >.

MCNAMARA, J. A. et al. Rapid maxillary expansion followed by fixed appliances: a long-term evaluation of changes in arch dimensions. **Angle Orthod**, v. 73, n. 4, p. 344-53, Aug 2003. ISSN 0003-3219. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12940553> >.

MEIKLE, M. C. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. **Eur J Orthod**, v. 28, n. 3, p. 221-40, Jun 2006. ISSN 0141-5387. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16687469> >.

MJÖR, I. A.; DAHL, E.; COX, C. F. Healing of pulp exposures: an ultrastructural study. **J Oral Pathol Med**, v. 20, n. 10, p. 496-501, Nov 1991. ISSN 0904-2512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1753353> >.

MJÖR, I. A.; STENVIK, A. Microradiography and histology of decalcified human teeth following experimental intrusion; with emphasis on resorption. **Arch Oral Biol**, v. 14, n.

12, p. 1355-64, Dec 1969. ISSN 0003-9969. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4188604> >.

MOLERI, A. B. et al. O Complexo Dentino-Pulpar. In: SIQUEIRA, J. J. F. e LOPES, H. P. (Ed.). **Endodontia: Biologia e Técnica**. 3^o edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p.1-19.

MOSS-SALENTIJJN, L.; HENDRICKS-KLYVERT, M. Calcified structures in human dental pulps. **J Endod**, v. 14, n. 4, p. 184-9, Apr 1988. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3077408> >.

MOSTAFA, Y. A.; ISKANDER, K. G.; EL-MANGOURY, N. H. Iatrogenic pulpal reactions to orthodontic extrusion. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 99, n. 1, p. 30-4, Jan 1991. ISSN 0889-5406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1986523> >.

MOSTAFA, Y. A.; WEAKS-DYBVIG, M.; OSDOBY, P. Orchestration of tooth movement. **Am J Orthod**, v. 83, n. 3, p. 245-50, Mar 1983. ISSN 0002-9416. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6299105> >.

NANCI, A. **Ten Cate - Histologia Oral**. 8^o edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

NIXON, C. E. et al. Histomorphometric study of dental pulp during orthodontic tooth movement. **J Endod**, v. 19, n. 1, p. 13-6, Jan 1993. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8289020> >.

OHZEKI, K. et al. Effect of cellular aging on the induction of cyclooxygenase-2 by mechanical stress in human periodontal ligament cells. **Mech Ageing Dev**, v. 108, n. 2, p. 151-63, May 1999. ISSN 0047-6374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10400308> >.

ONG, S. C. et al. The novel use of three-dimensional surface models to quantify and visualise the immediate changes of the mid-facial skeleton following rapid maxillary expansion. **Surgeon**, v. 13, n. 3, p. 132-8, Jun 2015. ISSN 1479-666X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24325933> >.

OPPENHEIM, A. Human tissue response to orthodontic intervention of short and long duration. **American Journal of Orthodontics and Oral Surgery**, v. 28, n. 5, p. 263-301, 1942.

ORBAN, B. **Odontoblastes in the dentinal tubule**. J Dent Res. 20: 553-557 p. 1941.

PAIRET, M.; ENGELHARDT, G. Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 10, n. 1, p. 1-17, 1996. ISSN 0767-3981. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8900495> >.

PATTERSON, S. S.; MITCHELL, D. F. Calcific metamorphosis of the dental pulp. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 20, n. 1, p. 94-101, 1965.

PIATTELLI, A.; TRISI, P. Pulp obliteration: a histological study. **J Endod**, v. 19, n. 5, p. 252-4, May 1993. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8360605> >.

POLVERINI, P. J. The pathophysiology of angiogenesis. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 6, n. 3, p. 230-47, 1995. ISSN 1045-4411. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8785263> >.

POLVERINI, P. J. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. **J Dent Educ**, v. 66, n. 8, p. 962-75, Aug 2002. ISSN 0022-0337. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12214844> >.

PÉREZ-NOVO, C. A. et al. Impact of RNA quality on reference gene expression stability. **Biotechniques**, v. 39, n. 1, p. 52, 54, 56, Jul 2005. ISSN 0736-6205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16060369> >.

RAMAZANZADEH, B. A. et al. Histological changes in human dental pulp following application of intrusive and extrusive orthodontic forces. **J Oral Sci**, v. 51, n. 1, p. 109-15, Mar 2009. ISSN 1343-4934. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325207> >.

RAVANSHAD, S.; KHAYAT, S.; FREIDONPOUR, N. The Prevalence of Pulp stones in Adult Patients of Shiraz Dental School, a Radiographic Assessment. **J Dent (Shiraz)**, v. 16, n. 4, p. 356-61, Dec 2015. ISSN 2345-6485. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26636125> >.

REITAN, K. Continuous bodily tooth movement and its histological significance. **Acta Odontol Scand**, v. 7, n. 2, p. 115-44, 1947.

REITAN, K. Tissue behavior during orthodontic tooth movement. **Am J Orthod**, v. 46, n. 12, p. 881-900, 1960.

REITAN, K. **Clinical and histological observation on tooth movement during and after orthodontic treatment.** *Am J Orthod*. 53: 721-45 p. 1967.

REITAN, K. Initial tissue behavior during apical root resorption. **Angle Orthod**, v. 44, n. 1, p. 68-82, Jan 1974. ISSN 0003-3219. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4520953> >.

ROBERTSON, A. et al. Long-term prognosis of crown-fractured permanent incisors. The effect of stage of root development and associated luxation injury. **Int J Paediatr Dent**, v. 10, n. 3, p. 191-9, Sep 2000. ISSN 0960-7439. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11310111> >.

ROBERTSON, A. Incidence of pulp necrosis subsequent to pulp canal obliteration from trauma of permanent incisors. **J Endod**, v. 22, n. 10, p. 557-60, Oct 1996. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9198446> >.

ROCK, W. P.; GRUNDY, M. C. The effect of luxation and subluxation upon the prognosis of traumatized incisor teeth. **J Dent**, v. 9, n. 3, p. 224-30, Sep 1981. ISSN 0300-5712. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6944333> >.

ROTSTEIN, I.; ENGEL, G. Conservative management of a combined endodontic-orthodontic lesion. **Endod Dent Traumatol**, v. 7, n. 6, p. 266-9, Dec 1991. ISSN 0109-2502. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1820860> >.

ROUZER, C. A.; MARNETT, L. J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. **J Lipid Res**, v. 50 Suppl, p. S29-34, Apr 2009. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952571> >.

SAITO, S.; SHIMIZU, N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 111, n. 5, p. 525-32, May 1997. ISSN 0889-5406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9155812> >.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Quantitative PCR. **CSH Protoc**, v. 2006, n. 1, Jun 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22485330> >.

SANDSTEDT, C. Einige Beiträge zur Theorie der Zahnregulierung. **Nord Tandt Tidsskr**, v. 5, p. 236-56, 1904.

SANDSTEDT, C. Einige Beiträge zur Theorie der Zahnregulierung. **Nord Tandt Tidsskr**, v. 6, p. 1-25, 141-68, 1905.

SANTAMARIA, M. et al. Initial pulp changes during orthodontic movement: histomorphological evaluation. **Braz Dent J**, v. 18, n. 1, p. 34-9, 2007. ISSN 0103-6440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17639198> >.

SANTAMARIA, M. et al. Initial changes in pulpal microvasculature during orthodontic tooth movement: a stereological study. **Eur J Orthod**, v. 28, n. 3, p. 217-20, Jun 2006. ISSN 0141-5387. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16675546> >.

SAWADA, M.; SHIMIZU, N. Stimulation of bone formation in the expanding mid-palatal suture by transforming growth factor-beta 1 in the rat. **Eur J Orthod**, v. 18, n. 2, p. 169-79, Apr 1996. ISSN 0141-5387. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8674502> >.

SELTZER, S.; BENDER, I. B. **The Dental Pulp: biologic considerations in dental procedures**. 3rd. Philadelphia: 1984. ISBN 0912791861 9780912791869.

SHIMIZU, N. et al. Induction of COX-2 expression by mechanical tension force in human periodontal ligament cells. **J Periodontol**, v. 69, n. 6, p. 670-7, Jun 1998. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660336> >.

SKILLEN, W. G.; REITAN, K. **Tissue changes following rotation of teeth in the dog**. The Angle Orthodontist. 10: 140-147 p. 1940.

SMYTH, K. C. Obliteration of the pulp of a permanent incisor at the age of 13-9 12 years. **Dent Rec (London)**, v. 70, n. 9-10, p. 218-9, 1950 Sep-Oct 1950. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24539302> >.

STENVIK, A.; MJÖR, I. A. Pulp and dentine reactions to experimental tooth intrusion. A histologic study of the initial changes. **Am J Orthod**, v. 57, n. 4, p. 370-85, Apr 1970. ISSN 0002-9416. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5265007> >.

SUZUKI, S. et al. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. **Matrix Biol**, v. 28, n. 4, p. 221-9, May 2009. ISSN 1569-1802. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19348940> >.

TAŞPINAR, F. et al. The histopathological investigation of pulpal tissue following heavy orthopaedic forces produced by rapid maxillary expansion. **J Int Med Res**, v. 31, n. 3, p. 197-201, 2003 May-Jun 2003. ISSN 0300-0605. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12870372> >.

TEN CATE, A. R. Dentin/pulp complex reactions: a reaction. **Proc Finn Dent Soc**, v. 88 Suppl 1, p. 275-8, 1992. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1508882> >.

TORNECK, C. D.; TORABINEJAD, M. Biologia da polpa e tecidos da região

periapical. In: WALTON, R. e TORABINEJAD, M. (Ed.). **Princípios e Prática em Endodontia**. 2º. Santos: Editora São Paulo, 1997. cap. Capítulo 2, p.6-28.

TSCHAMER, H. [Histology of dental pulp after activator treatment of late cases in adolescents]. **Zahnarztl Prax**, v. 25, n. 22, p. 530-1, Nov 1974. ISSN 0044-1651. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4533866> >.

VANDEVSKA-RADUNOVIC, V. et al. Changes in blood circulation in teeth and supporting tissues incident to experimental tooth movement. **Eur J Orthod**, v. 16, n. 5, p. 361-9, Oct 1994. ISSN 0141-5387. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7805809> >.

VON BÖHL, M. et al. Pulpal reactions to orthodontic force application in humans: a systematic review. **J Endod**, v. 38, n. 11, p. 1463-9, Nov 2012. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23063219> >.

WAGNER, E. M. Monitoring gene expression: quantitative real-time rt-PCR. **Methods Mol Biol**, v. 1027, p. 19-45, 2013. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23912981> >.

WOLFSON, E. M.; SELTZER, S. Reaction of rat connective tissue to some gutta-percha formulations. **J Endod**, v. 1, n. 12, p. 395-402, Dec 1975. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1062489> >.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v. 39, n. 1, p. 75-85, Jul 2005. ISSN 0736-6205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16060372> >.

YAMAGUCHI, M.; KASAI, K. **The effects of orthodontic mechanics on the dental pulp**. Seminars in Orthodontics: Elsevier Inc. 13: 272-280 p. 2007.

YAMAMOTO, R.; OIDA, S.; YAMAKOSHI, Y. Dentin Sialophosphoprotein-derived Proteins in the Dental Pulp. **J Dent Res**, v. 94, n. 8, p. 1120-7, Aug 2015. ISSN 1544-0591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25951824> >.

ZANDI, M.; MIRESMAEILI, A.; HEIDARI, A. Short-term skeletal and dental changes following bone-borne versus tooth-borne surgically assisted rapid maxillary expansion: a randomized clinical trial study. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 42, n. 7, p. 1190-5, Oct 2014. ISSN 1878-4119. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24704281> >.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO: Certificado de Aprovação da CEUA.



CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o Protocolo nº 2013.1.970.58.6 sobre a pesquisa intitulada **“Influência da inalação da fumaça de cigarro sobre remodelação óssea após a disjunção palatina em ratos”**, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Bernardete Sasso Stuani, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, APROVADO em reunião da CEUA de 16/10/2013 (60 animais), com alterações aprovadas em reunião da CEUA de 29/04/2015 (totalizando 85 animais).

We hereby certify that the protocol nº 2013.1.970.58.6 regarding the research entitled **“Effects of cigarette smoking in the bone healing after rapid maxillary expansion, in rats”**, under the responsibility of Profa. Dra. Maria Bernardete Sasso Stuani, is in accordance with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, was approved in 16/10/2013 (60 animals), with changes approved in 29/04/2015 (totalizing 85 animals).

Ribeirão Preto, 29 de abril de 2015.


Prof. Dra. Andriara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP