Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral
Área de Biologia Oral

*Avaliação temporal da expressão da proteína FOS em áreas
amigdalóides e hipotalâmicas após movimentação dentária
experimental em ratos.*

Ana Paula Ribeiro Novaes

Ribeirão Preto

2008

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral
Área de Biologia Oral

Avaliação temporal da expressão da proteína FOS em áreas amigdalóides e hipotalâmicas após movimentação dentária experimental em ratos.

Ana Paula Ribeiro Novaes

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral. Área de concentração: Biologia Oral

Orientadora: Profª. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Ribeirão Preto

2008

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL
DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU
ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE
CITADA A FONTE.**

FICHA CATALOGRÁFICA

Novaes, Ana Paula Ribeiro

Avaliação temporal da expressão da proteína FOS em áreas
amigdalóides e hipotalâmicas após movimentação dentária
experimental em ratos. Ribeirão Preto, 2008.

65 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia
Oral.

Orientador: Leite-Panissi, Christie Ramos Andrade.

1. Dor. 2. Movimentação dentária. 3. proteína FOS. 4. Sistema
límbico. 5. AINEs.

Folha de Aprovação

Ana Paula Ribeiro Novaes

“Avaliação temporal da expressão da proteína FOS em áreas amigdalóides e hipotalâmicas após movimentação dentária experimental em ratos”.

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto – USP, como
parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Reabilitação Oral. Área de
concentração: Biologia Oral

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

A Deus, pois Sua força me fez caminhar entre as adversidades, superar os desafios da vida e alcançar o quanto almejei.

Aos meus pais, Paulo e Raquel, fundamentais em minha vida, razão pela qual foi possível conquistar meus objetivos. Devo tudo a vocês!

A minha irmã Juliana, companheira de todas as horas, presença certa em todos os momentos.

Ao Jorge, pela amizade, carinho, companheirismo e incentivo ao longo dessa caminhada.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

A *Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi*, fonte de inspiração, amizade e dedicação, durante todos estes anos, sendo fundamental para o desenvolvimento deste trabalho; fornecendo, ainda, valiosos ensinamentos que levarei por toda a vida.

A *Profa. Dra Maria José Alves da Rocha*, por me acolher em seu laboratório e por sua valorosa contribuição desde o início do desenvolvimento deste trabalho.

A *Profa Dra Juliana Mazzonetto Teófilo*, pela fundamental colaboração na realização do processamento histológico.

Aos professores da banca, pela atenção dispensada na leitura desta dissertação.

Aos amigos do laboratório: *Alberto, Aline, Amanda, Bruno, Eveline e Priscila*, pela amizade e suporte, essenciais à consecução de mais esta etapa de minha busca por conhecimento.

Aos funcionários do Biotério I da FORP, *Sr. Antônio Sérgio Aparecido Mesca e Sr. Antônio Massaro* pelos cuidados com os animais experimentais.

A *Regiane de Cássia Tirado Damasceno*, secretária do Programa de Pós-Graduação de Biologia Oral da FORP – USP e *Lucimeire Resende Ribeiro*, técnica acadêmica do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da FORP – USP, que prestaram inestimável auxílio nos aspectos formais que aqui foram despendidos.

A *CAPES, PROEX e FAPESP*, pelo apoio financeiro.

“Resplandecente é a Sabedoria, e sua beleza é inalterável: os que a amam, descobrem-na facilmente, os que a procuram, encontram-na. Ela antecipa-se aos que a desejam. Quem para possuí-la, levanta-se de madrugada, não terá trabalho, porque a encontrará sentada à sua porta”. Sabedoria: 6, 12-14

RESUMO

Na realização do tratamento ortodôntico, é descrito que a dor ocorre imediatamente após a aplicação das forças ortodônticas e desaparece após alguns dias. Com relação às vias neurais envolvidas na mediação sensorial da movimentação ortodôntica (MO) poucos são os estudos que abordam esse tema, e nas últimas décadas achados consistentes demonstram o envolvimento do sistema trigeminal, bem como de suas áreas de projeção nessa mediação. Nesse contexto, achados demonstram que além de áreas do tronco encefálico, regiões da substância cinzenta periaquedutal, o núcleo espinhal do trigêmio, a área parabraquial e áreas límbicas apresentam aumento da imunorreatividade à proteína FOS (IR-FOS) 24hs após o início da movimentação dentária de molares de ratos. É possível que esta ativação límbica ocorra devido à liberação local de prostaglandinas. Assim, o presente trabalho avaliou temporalmente (3, 6, 24 e 48hs) a ativação do núcleo central da amígdala (CEA) e do hipotálamo lateral (HL) após MO. Em adição, verificamos se a pré-administração de diclofenaco de sódio (analgésico e antiinflamatório) ou de sulfato de morfina (analgésico de ação central) altera a IR-FOS após a aplicação de força para movimentação dentária de incisivos superiores de ratos, nas áreas analisadas. Nossos resultados mostram que a MO aumentou a IR-FOS no CEA e no HL após 3, 6 e 24hs. Após a MO por 48hs, a IR-FOS foi semelhante ao controle. A análise histológica do periodonto desses animais evidenciou processo ativo de remodelação óssea, sugerindo aposição de matriz colágena e a análise radiográfica demonstrou que a separação dos incisivos superiores dos animais ocorreu devido ao movimento ortodôntico e não ortopédico, já que não houve abertura da sutura palatina mediana. O pré-tratamento com sulfato de morfina (2mg/kg) inibiu a IR-FOS em ambas as áreas estudadas, sugerindo que a expressão de FOS após MO possa ser devido à transmissão da informação nociceptiva. Ainda, o pré-tratamento com diclofenaco de sódio (5mg/kg) reduziu a IR-FOS no CEA e no HL nos animais que receberam o aparelho ortodôntico por 6hs.

ABSTRACT

In the accomplishment of the orthodontic treatment, it is described that the pain happens immediately after the application of orthodontic forces and disappears after few days. Regarding the neural pathways involved in the sensorial mediation of the orthodontic movement (OM) few are the studies that approach this theme, and in the last decades solid founds demonstrate the involvement of the trigeminal system as well as its projection areas in this mediation. In this context, discoveries demonstrate that besides brainstem areas, such as periaqueductal gray matter, trigeminal spinal nucleus, and parabrachial area, limbic areas can present increase in FOS immunoreactivity (IR-FOS) 24 hours after the beginning of the tooth movement of rat molars. It is possible that this limbic activation happens due to the local liberation of prostaglandins. In this way, this work evaluated the activation of the central amygdala (CEA) and the lateral hypothalamus (LH) after OM. In addition, we verified if the previous administration of sodium diclofenac (painkiller and anti-inflammatory) or of morphine sulfate (painkiller of central action) alters IR-FOS after the application of force for tooth movement of rat superior incisors, in the analyzed limbic areas. Our results show that the OM increased the IR-FOS in CEA and in HL after 3, 6 and 24hs. After the OM for 48hs, the IR-FOS was similar to the control. The histological periodontal analysis of those animals evidenced an active process of bone remodeling, suggesting the deposition of osteoid material and the radiographic analysis demonstrated that the separation of the superior incisors of the animals happened due to the orthodontic movement and not orthopedic movement, since the interpremaxillary suture was fused. The pre-treatment with morphine sulfate (2mg/kg) inhibited the IR-FOS in both studied areas, suggesting that the expression of FOS after OM can be due to the transmission of nociceptive information. In addition, pre-treatment with sodium diclofenac (5mg/kg) reduced IR-FOS in CEA and in HL in the animals that received the orthodontic apparel for 6hs.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO.....	2
1. Movimentação Dentária.....	2
2. Estruturas do Sistema Nervoso Central.....	5
2.1. Amígdala	5
2.2. Hipotálamo	7
3. Proteína FOS	8
4. Antiinflamatórios	10
PROPOSIÇÃO.....	15
MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
1. Animais.....	16
2. Procedimento Experimental	16
3. Aparelho Ortodôntico	17
4. Congelamento do Tecido e Obtenção das Secções Encefálicas	18
5. Detecção Imunocitoquímica da proteína FOS.	19
6. Desidratação e diafanização do tecido.	20
7. Drogas	20
8. Protocolo Experimental 1: Avaliação temporal da expressão da proteína FOS após movimentação dentária experimental.	20
9. Protocolo Experimental 2: Avaliação do efeito da administração de um inibidor não-seletivo da enzima COX sobre a expressão da proteína FOS após movimentação dentária experimental	21
10. Processamento Histológico e Mensuração da Distância entre os Incisivos após a Movimentação Dentária	22
11. Análise Radiográfica	24
12. Análise de Imagem	24
13. Análise Estatística	25
RESULTADOS	26
Protocolo Edentária experimxperimental 1: Avaliação temporal da expressão da proteína FOS após movimentação ental.	26
Protocolo Experimental 2: Avaliação do efeito da administração de um inibidor não-seletivo da enzima COX sobre a expressão da proteína FOS após movimentação dentária experimental.....	36
DISCUSSÃO.....	39
CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
APÊNDICE.....	58

INTRODUÇÃO

1. Movimentação Dentária

Os pacientes durante tratamento ortodôntico, freqüentemente relatam ao cirurgião-dentista o desconforto e a sensação desagradável que ocorrem após a aplicação das forças ortodônticas. Em um estudo realizado com 203 pacientes submetidos a ortodontia corretiva, 91% desses pacientes reportaram dor após a aplicação de forças ortodônticas (LEW, 1993). Kvam e cols. (1987) revelaram que 95% dos pacientes relataram variados graus de desconforto durante a realização do tratamento. Estas sensações dolorosas são classificadas em duas fases: a primeira resposta aparece no momento da aplicação da força ortodôntica, desaparecendo imediatamente. Em um segundo momento, há novamente a sensação de dor intensa, um ou dois dias após a aplicação da força ortodôntica cessando poucos dias após. (JONES e cols., 1992).

Os mecanismos neurais através dos quais a informação dolorosa de origem orofacial, em particular, da dor gerada durante a movimentação ortodôntica é transmitida desde sua detecção pelos receptores sensoriais presentes nos ligamentos periodontais até áreas superiores do sistema nervoso central são pobremente entendidos devido à escassez de trabalhos científicos desenvolvidos nesta área de conhecimento. Sabe-se que essas informações são conduzidas por fibras nervosas aferentes primárias que inervam a polpa dentária e os ligamentos periodontais, cujos corpos neurais encontram-se no gânglio trigeminal e realizam a sua 1ª sinapse no complexo trigeminal do tronco encefálico, nas sub-regiões caudal e interpolar, ipsilateral à aplicação da força ortodôntica, do núcleo espinhal do trigêmio (MARFUT & TURNER, 1984). No entanto, avanços têm sido conseguidos nesta linha de investigação, utilizando-se para isto a avaliação da distribuição da proteína FOS. Dentro deste contexto, alguns trabalhos têm mostrado o aumento de sua expressão, em diferentes áreas do sistema nervoso central, após a

aplicação de um estímulo nocivo ou não-nocivo na região orofacial (ANTON e cols., 1991; COIMBRA & COIMBRA, 1994; EBERSBERGER e cols., 1995; BYERS e cols., 1990). Mais especificamente, Byers e cols. (1990) e Wakisaka e cols. (1992) evidenciaram aumento da expressão da proteína FOS em áreas do tronco encefálico, em particular no complexo trigeminal, após injúria ou tratamento dentário.

Utilizando o mapeamento neuronal com a imunorreatividade à proteína FOS, alguns autores têm demonstrado a distribuição temporal e espacial da proteína FOS no complexo trigeminal (AIHARA e cols., 1999; FUJIYOSHI e cols., 2000, MAGDALENA e cols., 2004), e também em outras áreas tal como a área parabraquial (YAMASHIRO e cols., 1998; HIROSHIMA, e cols., 2001) após a aplicação de forças ortodônticas em molares de ratos. Seguindo esta linha de investigação, trabalho de Kato e cols. (1994) evidenciou aumento da expressão da proteína FOS no núcleo espinhal do trigêmio durante movimentação dentária experimental em molares de ratos. Neste estudo, foi realizada a movimentação dentária, por meio da inserção de elásticos, para distalização dentária entre os molares superiores, técnica descrita inicialmente por Waldo (1953). Os resultados mostraram distribuição temporal do aumento da expressão da proteína FOS, observando um pico máximo de imunorreatividade entre 2 e 4 hs após a inserção dos elásticos, na sub-região caudal do núcleo espinhal do trigêmio. De fato, a sub-região caudal do núcleo espinhal do trigêmio pode modular a dor e o desconforto gerados pela movimentação dentária, pois esta região é a primeira estação sináptica da via nociceptiva trigeminal, a qual é responsável pela transmissão ascendente das informações nociceptivas das regiões orofaciais (ZIGMOND e cols., 1999). Além disso, estes achados experimentais são similares aos relatos clínicos dos pacientes submetidos aos tratamentos ortodônticos, onde eles relatam dor e desconforto severos, poucas horas após a aplicação da força para movimentação dentária (LEW, 1993; KHAM e cols., 1987).

Ainda, Fujiyoshi e cols. (2000) mostraram que há diferença de distribuição temporal da imunorreatividade para FOS no núcleo espinhal do trigêmio entre a subdivisão caudal e a região dorsomedial da subdivisão oral após a movimentação dentária. Neste trabalho há aumento bilateral na subdivisão caudal 2 horas após a aplicação da força ortodôntica diminuindo 12 horas após, com a expressão de um novo pico 48 horas após o início dos experimentos. Por outro lado, no subnúcleo oral somente ocorre aumento da expressão de FOS 24 horas após a aplicação da força de movimentação, apresentando um pico às 48 horas. Dessa forma acredita-se que o subnúcleo oral esteja envolvido com o segundo pico de dor ocasionado pela movimentação dentária. Estes dados sugerem que a atividade neural ocorre de uma forma bifásica mostrando similaridade com as observações clínicas, onde os pacientes relatam um novo pico de sensação dolorosa, um ou dois dias após o início do tratamento (JONES e cols., 1992).

Seguindo esta linha de investigação, Yamashiro e cols. (1998) demonstraram que a movimentação dentária experimental pode também induzir a expressão da proteína FOS em neurônios do núcleo central da amígdala, em núcleos hipotalâmicos e núcleos talâmicos. Estas estruturas são conhecidas por serem estações sinápticas da via espino(trigêmio)pontoamigdalóide (BERNARD e cols., 1989) e da via espino(trigêmio)pontohipotalâmica (BESTER e cols., 1995), envolvidas na transmissão da informação nociceptiva, em particular da região orofacial devido à estação sináptica na região do núcleo espinhal do trigêmio, subdivisão caudal. Possivelmente, estas vias descritas no início da década de 90 estão envolvidas na transmissão e na modulação do componente afetivo-motivacional da dor, bem como com as características comportamentais e autonômicas que envolvem os eventos nocivos (BERNARD & BESSON, 1990; BESTER e cols., 1995). O ponto inicial desta via localiza-se nas

lâminas I e V do corno dorsal da medula espinhal ou então, no núcleo espinhal, subnúcleo caudal, do nervo trigêmeo, onde se encontram neurônios que processam especificamente informações nociceptivas (CECHETTO e cols., 1985). Em adição, dados de nosso laboratório (NOVAES e cols., 2008 em preparação) demonstram que a aplicação de força controlada de 30 ou 70 g durante 3 horas nos incisivos centrais superiores de ratos é capaz de promover expressão de proteína FOS no núcleo central da amígdala e no hipotálamo lateral. Essa expressão depende da intensidade da força utilizada, pois foi observado recrutamento gradativo do número de células imunorreativas à proteína FOS de acordo com a intensidade do estímulo realizado, ou seja, 30 ou 70g de força.

2. Estruturas do Sistema Nervoso Central

2.1. Amígdala

A amígdala foi inicialmente definida por Völsch (1910, *apud* PITKÄEN e cols., 1997) e Johnston (1923, *apud* PITKÄEN e cols., 1997) como um agrupamento heterogêneo de núcleos localizados no lobo temporal. Em 1981, Kapp e cols. e Ursin e cols. descreveram esta estrutura como um conjunto de núcleos telencefálicos profundos no lobo temporal, estando entre a cápsula externa e o hipotálamo, e se estendendo rostralmente até o nível dos núcleos supraquiasmáticos e caudalmente para os corpos mamilares. Através de estudos cito e quimioarquitetônicos o complexo amigdalóide foi dividido em núcleos central, lateral, medial (AMARAL e cols., 1992) e núcleo basolateral (BRODAL, 1984).

Funcionalmente, a amígdala é uma estrutura do sistema límbico formada por núcleos que pertencem ao sistema nervoso autônomo (núcleo central), ao sistema vomeronasal (núcleos medial, posteromedial cortical e posterior), ao sistema olfatório

(núcleo basomedial e parte posterior do núcleo basolateral) e ao sistema frontotemporal cortical (núcleo lateral e parte anterior do núcleo basolateral). Anatomicamente, pode-se caracterizar essa estrutura por uma parte cortical (núcleo cortical e áreas que recebem estímulos olfatórios diretos), uma parte claustral (amígdala basolateral) e elementos estriados (núcleos central e medial) (SWANSON e PETROVICH, 1998).

Uma variedade de funções é atribuída ao complexo amigdalóide, incluindo memória e aprendizado, atenção, interpretação do significado emocional dos estímulos sensoriais, percepção dos movimentos corporais, geração dos aspectos emocionais dos sonhos, percepção da dor e ingestão de água e comida (GROSSMAN, 1964; BERNARD e cols., 1989; DAVIS, 1992). Em adição, o complexo amigdalóide, em particular o núcleo central da amígdala, está envolvido no sistema comportamental de defesa (LEDOUX e cols., 1988; HELMSTETTER, 1992; LEITE-PANISSI e cols., 1999) do qual o medo, a nocicepção, a antinocicepção e várias reações autonômicas fazem parte (MANNING e MAYER, 1995; LEITE-PANISSI e cols., 2003; LEITE-PANISSI e cols., 2004).

A amígdala desempenha um papel importante na transmissão e modulação da informação nociceptiva (HELMSTETTER e BELLGOWAN, 1993; MANNING e MAYER, 1995). Foi demonstrado que o complexo amigdalóide é de extrema importância para expressão de respostas nociceptivas condicionadas nos testes de retirada de cauda (HELMSTETTER e BELLGOWAN, 1993; WATKINS e cols., 1993) e de formalina (HELMSTETTER, 1992). Ainda, alguns trabalhos mostraram que a administração de morfina na amígdala é capaz de aumentar o limiar nociceptivo em diferentes testes algesimétricos (RODGERS, 1978; HELMSTETTER, 1993). Além disso, trabalho de Fox & Sorenson (1994) demonstrou que a lesão do núcleo central da amígdala de ratos foi capaz de reduzir a antinocicepção induzida pela exposição ao gato

ou pelo condicionamento clássico avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos. Esses achados reforçam a hipótese do envolvimento da amígdala, em particular do núcleo central na modulação da antinocicepção causada por eventos aversivos.

2.2. Hipotálamo

O hipotálamo é formado por um grupo de núcleos localizados no diencéfalo. Essa estrutura tem a função de controlar o sistema nervoso autônomo, o sistema endócrino, e está envolvido na integração de comportamentos específicos da espécie, dentre os quais se podem destacar os comportamentos de luta, fuga, alimentação e reprodução (GUYTON e HALL, 2002).

Embora o hipotálamo não seja tradicionalmente associado com o processamento nociceptivo, ele desempenha uma importante função na coordenação das informações autonômicas e sensoriais. Além disso, o hipotálamo está claramente envolvido na transmissão da informação nociceptiva, recebendo a maioria das vias ascendentes que transmitem essas informações a partir da medula espinhal e do complexo trigeminal diretamente ou indiretamente por meio de aferências da área parabraquial (GIESLER, 1995 a; BESTER e cols., 1995; MILLAN, 1999).

Estudos anatômicos demonstraram que apesar dos neurônios do núcleo parabraquial pontino fazerem sinapse, principalmente, no núcleo central da amígdala, esses axônios têm colaterais dirigidos para o tálamo e hipotálamo. Esta via com participação hipotalâmica está envolvida em reações afetivas-motivacionais, comportamentais e autonômicas ao estímulo nocivo (BERNARD e cols., 1993; BESTER e cols., 1995). De fato, o hipotálamo possui intensa interligação com o núcleo do trato solitário, substância cinzenta periaquedutal e medula rostroventromedial,

juntamente com estruturas corticolímbicas relacionadas com as dimensões afetivas e cognitivas da dor (MILLAN, 1999).

Em adição, alguns núcleos hipotalâmicos estão envolvidos no processamento e no controle descendente da informação nociceptiva. O núcleo medial pré-óptico, através de vias descendentes glutamatérgicas, projeta-se intensamente para a substância cinzenta periaquedutal e para medula rostroventromedial (JIANG e BEHBEHANI, 2001). Esse núcleo desempenha importante função nas respostas autonômicas à dor e a sua estimulação inibe a ativação de neurônios espinhais ao estímulo nocivo (LUMB, 1990). Ainda, a estimulação mecânica ou térmica do hipotálamo anterior suprime a resposta dos neurônios de ampla faixa dinâmica, localizados no corno dorsal da medula espinhal, aos estímulos nocivos (WORKMAN e LUMB, 1997). Em adição, a estimulação elétrica do hipotálamo lateral produz antinocicepção por meio de projeções para substância cinzenta periaquedutal e o núcleo magno da rafe, os quais são responsáveis pela ativação das vias descendentes noradrenérgicas que modulam as respostas nociceptivas de neurônios localizados no corno dorsal da medula espinhal, ou no subnúcleo caudal do complexo trigeminal (DAFNY e cols., 1996; HOLDEN e NALEWAY, 2001).

3. Proteína FOS

A proteína FOS é o resultado da expressão gênica do proto-oncogene *c-fos*. Em condições fisiológicas, os proto-oncogenes estão envolvidos na regulação do crescimento e da divisão celular. Porém, quando expressos de forma inadequada, esses genes dão origem a oncogenes, definidos como elementos genéticos que podem causar alteração celular patológica (BISHOP, 1985; MORGAN e CURRAN, 1991).

Os proto-oncogenes são responsáveis por codificar proteínas nucleares que agem na transmissão de sinais intra e intercelulares. Os ligantes extracelulares interagem com seus receptores de membrana plasmática promovendo uma série de informações ao citoplasma através da transdução de sinais nervosos. A cascata de transdução de sinais se estende ao núcleo e a atividade neural é capaz de causar alterações na expressão gênica de células pós-sinápticas (MORGAN e CURRAN, 1991; ARMSTRONG e MONTIMINY, 1993).

Além do gene c-fos, o gene c-jun também pertence à família dos proto-oncogenes. As proteínas expressas por esse genes são formadas no citoplasma, entretanto, possivelmente em resposta ao aumento intracelular de segundos mensageiros (proteína quinase C, cálcio, adenosinamono-fosfato cíclica), as proteínas FOS e JUN voltam ao núcleo neuronal onde são dimerizadas por meio do denominado “zíper de leucina” (LANDSCHULZ e cols., 1988, GENTZ e cols., 1989; CURRAN e cols., 1984). No núcleo, os complexos protéicos formados por homodímeros (JUN-JUN) ou heterodímeros (FOS-JUN), são classificados como proteínas ativadoras 1 (AP-1). Esses complexos possuem a capacidade de se ligarem, especificamente, a elementos do DNA, com sequência de nucleotídeos TGACTCA, que contém o sítio de ligação AP-1 (sítios regulatórios de transcrição do DNA), e estão presentes em genes-alvos podendo atuar como fatores de transcrição. A presença de FOS no heterodímero FOS-JUN determina a maior afinidade do complexo AP-1 pelo DNA, por aumentar a estabilidade da interação proteína-DNA (RAUSCHER et al, 1988; FELDMAN et al, 1997).

A descoberta do gene c-fos no sistema nervoso central após estimulação nociva periférica (HUNT e cols., 1987) propiciou intensa investigação sobre as vias neurais envolvidas na nocicepção, e desde então, a expressão da proteína FOS tem sido utilizada para mapear vias nociceptivas, bem como para examinar os fatores que

modulam suas atividades (HERDEGEN e LEAH, 1998). Através de técnicas de biologia molecular, como a imunohistoquímica, é possível marcar a interação de um anticorpo específico com a proteína FOS. Essa técnica permite a localização neuroanatômica do substrato neural ativado por estímulos específicos (CURRAN e MORGAN, 1995; CAMPEAU e cols., 1997). Estimulação nociva de natureza mecânica, química ou térmica do membro posterior ou da cauda ou a estimulação elétrica de fibras tipo C do membro posterior de ratos resultam em distribuição bilateral similar de células imunorreativas á proteína FOS em diversas regiões do sistema nervoso central (BULLIT, 1990; HERMANSON e BLOMQVIST, 1997 a). Essas regiões incluem núcleos sensoriais, nociceptivos, motores somáticos e viscerais, autonômicos, talâmicos e hipotalâmicos, e amigdalóides (HERDEGEN e LEAH, 1998).

4 Antiinflamatórios

A dor odontológica, em especial a ocasionada pela movimentação dentária, e a grande maioria das algias odontológicas tem sua etiologia nos processos inflamatórios. O movimento ortodôntico é causado por estímulos mecânicos e é facilitado pela remodelação do ligamento periodontal e do osso alveolar, ocorrendo osteólise no lado de compressão e formação óssea no lado de tração (KING e cols., 1991). A condição essencial para remodelação e conseqüentemente para que o elemento dentário se movimente é a instalação de um processo inflamatório (VANDEVSKA-RADUNOVIC, 1999). De fato, estudos mostram que a movimentação ortodôntica envolve intensa resposta inflamatória, caracterizada por vasodilatação periodontal e migração de leucócitos para fora dos capilares. Estas respostas inflamatórias são mediadas por citocinas (STOREY, 1973) que segundo Dinarello (1988) e Lê e Vilcek (1987) são mediadores bioquímicos locais que podem provocar a síntese e secreção de numerosas substâncias por meio de suas células alvos,

incluindo prostaglandinas. As citocinas, tais como Interleucina - 1 β (IL-1 β), atuam como mediadores conhecidos por desencadear uma variedade de ações importantes para o mecanismo de defesa e auto-imune. Especificamente, a IL-1 β é um dos mediadores responsáveis pela descarga de prostaglandinas (PGs) durante o processo inflamatório (SAITO e cols., 1991).

As PGs são mediadores lipídicos sintetizados a partir do ácido aracdônico através da ativação das enzimas cicloxigenases (COX 1 e COX 2) (MATSUMURA e KOBAYASHI, 2004). Por sua vez, as PGs exercem uma variedade de efeitos sobre os vasos sanguíneos, nas terminações nervosas e nas células envolvidas na inflamação (SCHUTZ e cols., 1997). Com relação às ações das PGs sobre a sensibilidade dolorosa, de fato a presença de PGE1 e PGE2 sensibiliza terminais nervosos nociceptivos aferentes, tal como a bradicinina (mediador inflamatório). Assim, na presença destas PGs, mesmo em concentrações demasiadamente baixas de outros mediadores inflamatórios, como 5-hidroxitriptamina (5-HT) ou bradicinina, ocorre alta sensibilidade dolorosa (RANG e cols., 1997). Ainda, é possível que o ácido ascórbico, ativador da isozima cicloxigenase (COX2) responsável pela produção de PGs em células envolvidas na inflamação (RANG e cols., 1997), seja necessário para organização do ligamento periodontal e do osso alveolar (osteogênese) durante aplicação da força ortodôntica (LITTON, 1974). De fato, a injeção local de PGE1 é responsável pela duplicação da taxa de movimentação dentária durante o tratamento ortodôntico clínico (YAMASAKI e cols., 1984).

Estudos demonstram que determinados tipos de peptídeos também têm influência no processo inflamatório durante a movimentação dentária. Desta forma, Saito e cols. (1991), mostraram que após a aplicação de força ortodôntica em molares de ratos ocorreu aumento da imunorreatividade para o peptídeo ligado ao gene da calcitonina (PLGC) em vasos sanguíneos dos ligamentos periodontais, atingindo um pico 3 dias após a manipulação

experimental É interessante ressaltar que este peptídeo é conhecido por exercer múltiplas funções tais como neurotransmissor, neuromodulador, e vasodilatador (BRAIN e cols., 1985; ISHII-YAMAMOTO & TOYAMA, 1989). Além disso, alguns estudos têm relacionado o PLGC com a inflamação neurogênica e com a ativação de células inflamatórias (PECK, 1987) suportando, portanto, o envolvimento deste peptídeo com a dor e os desconfortos gerados pela movimentação ortodôntica. Assim, o aumento da imunorreatividade para o PLGC pode ser utilizado como um indicativo de que a movimentação dentária é capaz de promover alterações nos elementos periodontais, as quais contribuem para a sensação de dor e desconforto relatados pelos pacientes da clínica ortodôntica.

Diferentes métodos foram desenvolvidos para entender os mecanismos de controle da dor. Métodos como aplicação de laser de baixa intensidade aos tecidos periodontais (LIM e cols., 1995), estimulação nervosa elétrica transcutânea (ROTH e THRASH, 1986; WEISS e CARVER, 1994) e estimulação vibratória do ligamento periodontal (MARIE e cols., 2003) foram testados e resultaram em algum nível de diminuição da sensação dolorosa. No entanto, o uso de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (AINES) é o método mais utilizado para o controle da dor relacionada com a aplicação de forças ortodônticas (POLAT e cols., 2005)

Portanto, o conhecimento dos mecanismos dos AINES é de suma importância para que se possam ter opções terapêuticas seguras e rápidas no controle dos problemas advindos da inflamação. Evidências fornecidas por Arbex e cols. (1992), relatam que os AINES possuem propriedades anti-trombótica, antitérmica, analgésica e antiinflamatória. Seu efeito antiinflamatório é devido à inibição da síntese de PGs, efetuada mediante a inativação da enzima COX. Esta inativação se dá de forma reversível e irreversível, dependendo do tipo de AINES empregado. De acordo com Freitas (1997), os AINES são eficazes, principalmente,

contra aqueles tipos de dor em que as PGs agem sensibilizando os nociceptores, como dores associadas à inflamação ou danos teciduais. Dentro deste contexto, foi demonstrado que AINES administrados intratectal podem produzir analgesia, sugerindo que a inibição da geração das PGs na medula espinhal pode contribuir para sua ação analgésica (RANG e cols., 1997).

Segundo Meade e cols. (1993) e Mitchell e cols. (1993), há dois tipos de COX, a COX₁ e a COX₂. Como característica principal, a COX₁ é uma enzima constitucional expressa em muitos tecidos, incluindo as plaquetas, e está envolvida na sinalização de uma célula para outra e na homeostase tecidual. Por outro lado, a COX₂ está presente em células inflamatórias que são recrutadas durante o processo inflamatório, sendo a enzima que produz os mediadores da inflamação da classe dos prostanóides, que inclui as prostaglandinas. Muitos AINES atualmente em uso são inibidores de ambas as isoenzimas, embora variem quanto ao grau de inibição de cada uma delas. De acordo com Rang e cols. (1997), a ação dos AINES está claramente relacionada com sua inibição da COX₂ e seus efeitos indesejados se devam principalmente a inibição da isoenzima COX₁. Estas considerações explicam a alta eficiência dos AINES para o controle da dor associada à artrite, bursite, dor de origem muscular e vascular, odontalgia, dismenorréia, dor pós-parto e a dor de metástases de câncer ósseo, todas associadas ao aumento de PGs (SAYAGO, 1994).

Com relação ao uso dos AINES para tratamento da dor orofacial, trabalho de Sukriti e cols. (2004), avaliou o efeito da administração do diclofenaco de sódio no teste de formalina orofacial. Seus resultados demonstraram que este medicamento produziu inibição dose-dependente do índice nociceptivo nas fases aguda e tônica deste teste algesimétrico. Estes dados demonstram que os AINES com ação analgésica e antiinflamatória podem ser efetivos para o tratamento de dor orofacial e que podem ser utilizadas em modelos algesimétricos orofaciais.

O uso de analgésicos como os AINES, que inibem a liberação de PGs, e conseqüentemente, inibem o processo inflamatório, é efetivo no tratamento da dor decorrente do tratamento ortodôntico (NGAN e cols.; 1994). No entanto, estudos de Sandy e Harris (1984) e Chumbley e Tuncay (1986) demonstram que o uso contínuo dos AINES para redução do desconforto causado pela movimentação ortodôntica não é apropriado, pois seu uso poderia diminuir a movimentação dentária. Em adição, estudo de Arias e Marquez-Orozco (2006) comparando diferentes analgésicos administrados durante 10 dias e seus efeitos no movimento ortodôntico, demonstrou que o uso de aspirina e ibuprofeno, drogas antiinflamatórias que inibem a liberação de PGs, reduziu o número de lacunas de reabsorção óssea nas áreas de compressão, dos dentes que receberam aplicação de força ortodôntica, quando comparados com animais que não receberam antiinflamatório (controle) e com aqueles que receberam acetaminofen, medicamento que não afeta a secreção periférica de PGs. Esse trabalho ainda demonstra que a taxa de movimentação dentária durante os 10 dias de estudo foi menor nos animais tratados com aspirina e ibuprofeno do que nos animais controle e naqueles que receberam acetaminofen.

PROPOSIÇÃO

Com base na literatura acima apresentada, o objetivo do presente trabalho foi avaliar temporalmente a ativação de estruturas límbicas envolvidas na movimentação ortodôntica. Em particular, realizamos a observação da distribuição espacial e temporal (3, 6, 24 e 48 horas após o início da movimentação dentária) da proteína FOS no núcleo central da amígdala e no hipotálamo lateral. Ainda, foi avaliado o efeito da administração prévia de sulfato de morfina, um potente analgésico de ação central, na expressão da proteína FOS nestas estruturas após 3 horas de movimentação ortodôntica. Em adição, na segunda etapa deste trabalho, avaliamos se a administração prévia de diclofenaco de sódio, um antiinflamatório e analgésico inibidor não seletivo da enzima COX, foi capaz de promover alteração na expressão da proteína FOS 6 horas após a aplicação de força controlada para movimentação dentária, nas áreas encefálicas analisadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (n = 81, 250 a 300 gramas) cedidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em caixas acrílicas coletivas (5 animais por caixa) com 1353 cm² de área, em ambiente com temperatura controlada (24 °C ± 1 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro se iniciando às 7 horas), com água e comida *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com os regulamentos e cuidados na utilização de animais em laboratórios, conforme a Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, e foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Prefeitura do *Campus* Administrativo de Ribeirão Preto/USP (Processo nº06.1.275.53.8).

2. Procedimento Experimental

No dia experimental, os animais foram divididos em diferentes grupos experimentais em que se administrou ou não diclofenaco de sódio ou sulfato de morfina 30 minutos antes da anestesia inicial. Os animais foram anestesiados com uma associação de ketamina (100 mg/Kg) e xilasina (14 mg/Kg). Após a anestesia os animais foram novamente divididos em diferentes grupos experimentais que receberam ou não o aparelho ortodôntico para movimentação dentária, como será descrito adiante. Após o período de movimentação dentária, ou seja, 3, 6, 24 ou 48 horas do início dos experimentos, foi realizada nova anestesia, de acordo com o protocolo experimental proposto, e estes animais foram perfundidos com solução salina tamponada (PBS; 0,05 M, pH = 7,4) seguida por solução de paraformaldeído 4%. A seguir os encéfalos foram removidos e mantidos no mesmo fixador por aproximadamente 3 horas, sendo então o material transferido para uma solução de sacarose

30% em PBS para posteriormente ser processado pela técnica de imunocitoquímica para proteína FOS.

3. Aparelho Ortodôntico

O aparelho ortodôntico utilizado foi semelhante ao descrito por Magdalena e cols. (2004). Resumidamente, o aparelho é composto de uma mola helicoidal dupla confeccionada em fio de aço inoxidável 0,016 polegadas (3M – Unitek), tendo suas extremidades soldadas a 2 bandas confeccionadas a partir de fita para bandar (0,10mm X 4,50mm – Moreli ortodontia) (Figura 1). A ativação do aparelho foi realizada com o auxílio de um tensiômetro (ETM – 1303) para exercer força inicial de distalização nos incisivos centrais superiores de 70 gramas, sendo aproximadamente 35 g em cada extremidade. A cimentação do aparelho ortodôntico foi realizada com o uso de um cimento odontológico à base de fosfato de zinco (SS White) (Figura 2).

Figura 1: Fotografia do aparelho utilizado para realização da movimentação dentária experimental. Escala apresentada em cm.

Figura 2: Fotografia de um animal experimental após a cimentação do aparelho ortodôntico.

4. Congelamento do Tecido e Obtenção das Secções Encefálicas

O congelamento do tecido foi realizado com isopentana 99% (C_5H_{12} – Vetec) mantida em gelo seco a $40^{\circ}C$ negativos. Cada encéfalo foi mantido próximo a isopentana (no vapor) por 10 segundos, sendo então mergulhado nesta solução por aproximadamente 10 a 12 segundos. Após este procedimento, os encéfalos foram armazenados no freezer a $20^{\circ}C$ negativos, ou então, foram imediatamente colocados no criostato ($-20^{\circ}C \pm 1$) para início dos cortes.

Os cortes de tecido foram realizado em criostato (marca MICROM, modelo HM 505E) na espessura de $40\mu m$. Secções adjacentes da amígdala e hipotálamo foram colhidas em placas de acrílico (± 12 cortes) contendo PBS 0,01 M, pH 7,4 para realização da imunocitoquímica para a proteína FOS. Um conjunto de secções adjacentes foi colhido em placas de acrílico, porém contendo solução anti-congelante, sendo então armazenado o material em freezer a $20^{\circ}C$ negativos. Para determinação das áreas encefálicas foi utilizado como parâmetro o Atlas de Swanson (1992).

5. Detecção Imunocitoquímica da proteína FOS.

O processamento imunocitoquímico para detecção da proteína FOS foi realizado imediatamente após a realização dos cortes do tecido em criostato. Primeiramente, os cortes foram enxaguados em solução de lavagem (PBS 0,01 M, *pH* 7,4) três vezes, 5 minutos cada. O volume ideal de tampão foi aquele que cobriu totalmente as secções durante as incubações que foram realizadas em placa de agitação orbital (Kline CT-150).

Em seguida, foram incubados com PBS 0,01 M contendo peróxido de hidrogênio 1% (H₂O₂ 1 % v:v) durante 10 minutos. Os cortes foram novamente enxaguados, por quatro vezes, 5 minutos cada com PBS 0,01 M, *pH* 7,4. Na sequência os cortes foram incubados com o anticorpo primário. Foi utilizado o anticorpo primário policlonal de coelho antiproteína FOS (SC 52, Santa Cruz Biotechnology) na diluição de 1:2000 em PBS + (PBS contendo triton X100, 0,2 % e soroalbumina bovina – BSA – 0,1 %). A incubação foi realizada por um período mínimo de 20 horas, à temperatura ambiente de 22 °C ± 1°C.

No segundo dia, as secções foram lavadas com PBS 0,01 M *pH* 7,4 para eliminar o excesso de anticorpo primário e as ligações inespecíficas. Foi utilizado um anticorpo secundário, uma anti-IgG de coelho, Vectastain, Vector Laboratories, marcado com uma molécula de biotina. O anticorpo secundário foi diluído na proporção de 1:400, em PBS+. Esta solução permaneceu por uma hora em contato com o tecido sob agitação, à temperatura ambiente. Após este período foi realizada nova série de lavagem com PBS 0,01 M *pH* 7,4.

Na próxima etapa foi realizada a incubação com complexo AB que corresponde à solução de Avidina-Biotina-Peroxidase (solução A e B do kit ABC, Vectastain, Vector Laboratories). Esta solução foi adicionada ao meio, permanecendo por 1 hora e depois foram feitas lavagens com PBS 0,01 M *pH* 7,4. A solução foi preparada 30 minutos antes da incubação. O complexo AB foi revelado com 3-3' diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio (0,04% de H₂O₂ 30%), durante 10 minutos. Ao final da reação um composto

colorido e insolúvel, marrom escuro, depositado no interior dos núcleos neuronais se precipita marcando a localização do anticorpo primário no tecido.

6. Desidratação e diafanização do tecido.

Após o término da reação, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas. Depois de secas foi realizado o processo de desidratação do tecido, onde as lâminas passaram por uma série de concentrações crescentes de álcoois (75 %, 95 %, 100 %, 100 %). Logo após passaram por solução álcool/xilol (50 % v:v) e xilol 100 % (2X). Após a secagem os cortes foram cobertos com Entellan (Sigma) e lamínula.

7. Drogas

O diclofenaco de sódio foi utilizado (Diclofenaco 50 - Ouro Fino Saúde Animal Ltda) na diluição de 5% em veículo q.s.p. A dose utilizada foi de 5 mg/kg i.m. Esta dose foi baseada em estudos prévios de Minossi e cols. (2001) e de acordo com a determinação do fabricante para proporcionar efeito antiinflamatório.

O sulfato de morfina (Dimrof[®], Cristália) foi dissolvido em água destilada, na dose de 2 mg/kg i.p. Esta dose foi baseada em estudos prévios de Powell e cols. (2002), Reboriças e cols. (2005) e em estudos pilotos.

8. Protocolo Experimental 1: Avaliação temporal da expressão da proteína FOS após movimentação dentária experimental.

Grupo 1 (controle, $n=33$): animais desse grupo foram apenas manipulados com procedimentos semelhantes aos utilizados para colocação do aparelho e durante o mesmo tempo gasto para tal procedimento, sendo perfundidos 3 ($n=8$), 6 ($n=8$), 24

($n=9$) e 48 horas ($n=8$) após a manipulação. O objetivo deste procedimento foi avaliar se apenas a manipulação para colocar o referido aparelho *per si* foi capaz de induzir a expressão de FOS nas áreas estudadas.

Grupo 2 ($n=31$): após anestesia inicial os animais receberam o aparelho ortodôntico descrito com força de distalização de 70 g, sendo perfundidos após 3 ($n=8$), 6 ($n=8$), 24 ($n=8$) e 48 horas ($n=7$) de movimentação dentária.

Grupo 3 ($n=6$): 30 minutos antes da anestesia inicial os animais desse grupo receberam administração intraperitoneal de sulfato de morfina (2 mg/kg). Após esse período receberam aparelho ortodôntico com força de distalização de 70 g. Após 3 horas estes animais foram novamente anestesiados e perfundidos.

9. Protocolo Experimental 2: Avaliação do efeito da administração de um inibidor não-seletivo da enzima COX sobre a expressão da proteína FOS após movimentação dentária experimental

Grupo 1 ($n=5$): após anestesia inicial os animais desse grupo receberam administração de diclofenaco de sódio (5 mg/Kg, i.m., Minossi e cols., 2001) e foram apenas manipulados com procedimentos semelhantes aos utilizados para colocação do aparelho e durante o mesmo tempo gasto para tal procedimento, sendo perfundidos após 6 horas. O objetivo deste procedimento foi avaliar se o diclofenaco de sódio *per si* é capaz de alterar a expressão da proteína FOS nas estruturas encefálicas em estudo, o núcleo central da amígdala e o hipotálamo lateral.

Grupo 2 ($n=6$): após anestesia inicial os animais desse grupo receberam administração de diclofenaco de sódio (5 mg/kg, i.m.) e receberam o aparelho ortodôntico com força de distalização de 70 g. Após 6 horas esses animais foram novamente anestesiados e foram perfundidos conforme descrito anteriormente.

10. Processamento Histológico e Mensuração da Distância entre os Incisivos após a Movimentação Dentária

Para avaliação histológica da movimentação dentária realizada em nosso trabalho, após a eutanásia e remoção dos encéfalos, os animais foram decapitados e após a remoção das mandíbulas, as cabeças foram imersas em solução de paraformol a 4% por 3 dias. Após este período, as cabeças foram descalcificadas em solução de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 30% (técnica de MORSE, 1945, modificada) por cerca de 20 dias, renovando-se a solução a cada 2 dias. Após a descalcificação, realizou-se dois cortes paralelos entre si e perpendiculares ao plano oclusal dos molares superiores: a) tangenciando a face mesial do primeiro molar superior e b) outro seguindo a face palatina dos incisivos centrais superiores para obtenção de um fragmento contendo as raízes dos incisivos (Figura 3). As peças foram então lavadas por 24 horas em água corrente, desidratadas, diafanizadas, incluídas em parafina e orientadas de maneira a permitir cortes semi-seriados transversais de 7 μ m de espessura (a intervalos de 70 μ m) da face anterior das peças, que posteriormente foram coradas com hematoxilina e eosina.

Figura 3: Ilustração da visão lateral de crânio de rato Wistar. A linha c indica o plano oclusal dos molares superiores e as linhas a e b a incidência dos cortes durante a preparação da peça.

Com auxílio de um microscópio óptico (Leica DM LB2) com câmera digital (Câmera Leica DC 300F) para captura de imagem e de um programa para mensurações; munido dos *softwares* Leica IM50 versão 4.0 e Image J. As imagens foram captadas em aumento final de 25X.

Para padronizar-se a mensuração da movimentação dentária, determinou-se a mediana da circunferência das raízes e estabeleceram-se duas retas paralelas entre si e que tangenciavam simultaneamente as faces vestibulares e palatinas das raízes. A intersecção dessas retas determinou um ponto chamado de G. A distância entre os pontos G foi a referência para determinar-se a distância entre as duas raízes dentárias. (Figura 4).

Figura 4: Ilustração do procedimento de mensuração da distância entre os incisivos superiores dos animais experimentais. Após determinar-se duas retas paralelas entre si (P) e a mediana da circunferência dental (M), determinou-se a intersecção entre a mediana e a paralela (ponto G). A distância entre os pontos G foi usada como referência para medir a distância (dist) entre os elementos dentais (D).

Todos os procedimentos descritos neste item (10 Processamento Histológico e Mensuração da Distância entre os Incisivos após a Movimentação Dentária) foram realizados com auxílio da Profa Dra Juliana Mazzonetto Teófilo do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

11. Análise Radiográfica

Em animais adultos, a sutura palatina mediana já está fusionada. Dessa forma, a separação dos incisivos superiores de ratos adultos ocorre devido ao movimento ortodôntico e não ortopédico (STOREY, 1955). Para avaliação radiográfica da movimentação dentária, radiografias iniciais e finais dos animais submetidos à movimentação dentária, radiografias iniciais e finais dos animais submetidos à movimentação ortodôntica dos incisivos superiores foram feitas para comprovar que em nossos experimentos estamos realizando movimentação ortodôntica e não ortopédica (Figura 5).

Figura 5: Radiografias da sutura palatina de ratos. (A) animal controle, sem a cimentação do aparelho ortodôntico. (B) animal após movimentação ortodôntica com força de 70 gramas por 48 horas.

12. Análise de Imagem

As secções de tecido foram analisadas em microscópio (Axiostar plus) e as imagens foram capturadas por meio da utilização de um sistema de análise de imagem

(Axio Vision 4 AC). Para esta avaliação foi utilizado o programa processador de imagem Image J de domínio público inspirado no NIH Image J para Macintosh. A análise da densidade neuronal positivamente marcada para a proteína FOS foi obtida por meio da contagem do número de células com marcação positiva na região determinada e limitada do tecido nervoso, considerando as referências anatômicas da região a ser investigada, o núcleo central da amígdala e o hipotálamo lateral (Swanson, 1992). Os dados são apresentados como média de células imunorreativas em uma área de $0,1 \text{ mm}^2 \pm$ erro padrão da média (EPM). Para cada animal foram quantificados três cortes encefálicos, e então realizada uma média da contagem. Ao final das avaliações de cada valor individual, foi transformado em uma área constante de $0,1 \text{ mm}^2$.

13. Análise Estatística

Para análise estatística foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman Keuls. Os dados foram considerados significativos apenas quando $P < 0,05$. Os resultados serão apresentados como densidade média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de células imunorreativas para $0,01 \text{ mm}^2$ para área em estudo (núcleo central da amígdala e hipotálamo lateral), seguindo os parâmetros anatômicos da Atlas de Swanson (1992) para ratos. Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico SigmaStat 3.1.

RESULTADOS

Protocolo Experimental 1: Avaliação temporal da expressão da proteína FOS após movimentação dentária experimental.

Nossos resultados mostraram que após 3 e 6 horas de movimentação dentária, experimental com utilização de força controlada de 70g nos incisivos centrais superiores de ratos, ocorreu marcação da proteína FOS (IR-FOS) em células localizadas bilateralmente nas estruturas em estudo, ou seja, no núcleo central da amígdala (CEA) e no hipotálamo lateral (HL). Além disso, foi possível verificar que a expressão da proteína FOS continua elevada após 24 horas, apresentando redução somente 48 horas após a aplicação de força de movimentação dentária (Figuras 6 e 7). Em adição, a pré-administração de sulfato de morfina foi capaz de bloquear a imunorreatividade à proteína FOS 3 horas após a movimentação dentária com 70g nas estruturas analisadas (Figura 8).

Em particular, os animais manipulados (grupo 1) apresentaram reduzida expressão de FOS com apenas algumas células imunorreativas dispersas no CEA após 3, 6, 24 e 48 horas de movimentação dentária ($9,51 \pm 3,06$; $14,26 \pm 3,06$; $8,79 \pm 2,88$; $7,85 \pm 3,06$ células IR-FOS, respectivamente, Figura 6 A) e no HL ($8,39 \pm 2,13$; $14,04 \pm 2,13$; $13,53 \pm 2,00$; $7,10 \pm 2,13$ células IR-FOS, respectivamente, Figura 7 A).

Nos grupos experimentais em que os animais receberam o aparelho ortodôntico com força de distalização de 70 gramas a expressão de FOS nas áreas estudadas aumentou em relação aos animais controle após 3 horas ($44,32 \pm 3,06$ no CEA e $19,46 \pm 2,27$ no HL), atingindo seu máximo no tempo de 6 horas ($47,81 \pm 3,06$ no CEA e $37,02 \pm 2,13$ células IR-FOS no HL) e diminuindo progressivamente após 24 ($18,99 \pm 3,06$

células IR-FOS no CEA e $20,81 \pm 2,13$ células IR-FOS no HL) e 48 horas ($8,97 \pm 3,27$ células IR-FOS no CEA e $8,23 \pm 2,27$ células IR-FOS no HL). (Figuras 9 e 10).

A análise estatística demonstrou diferença significativa entre os animais que receberam o aparelho ortodôntico por 3, 6 e 24 horas, em ambas as áreas estudadas ($F_{1,63} = 85,41$; $F_{1,62} = 48,80$, $p < 0,001$, ANOVA, para o CEA e para o HL, respectivamente), quando comparados ($p < 0,05$, Newman-Keuls) com os seus respectivos controles, ou seja, os animais que foram apenas manipulados. No tempo de 48 horas não foram identificadas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos para ambas as estruturas. Diferença significativa também foi evidenciada entre os animais que receberam o aparelho ortodôntico com força de distalização de 70 gramas nos diferentes intervalos de tempo. Os grupos que receberam o aparelho ortodôntico por 3, 6 e 24 horas apresentaram expressão da proteína FOS significativamente maior que os animais que receberam o aparelho por 48 horas em ambas as áreas estudadas ($F_{3,63} = 15,14$, $p < 0,001$ no CEA; $F_{3,62} = 9,17$, $p < 0,001$ no HL, ANOVA). Ainda, no núcleo central da amígdala, os animais que receberam o aparelho ortodôntico por 3 e 6 horas apresentaram expressão da proteína FOS significativamente maior que os animais que receberam o aparelho por 24 horas. Na região do hipotálamo lateral, os animais que receberam o aparelho ortodôntico por 6 horas apresentaram expressão da proteína FOS significativamente maior que os animais que receberam o aparelho por 3 e 24 horas. (Figuras 9 e 10).

Ainda nesta etapa do trabalho, realizamos o grupo experimental que recebeu sulfato de morfina (2mg/kg) 30 minutos antes da realização da movimentação dentária. Nesses animais, a densidade média de células IR-FOS localizadas no CEA foi de $0,77 \pm 0,49$ células IR-FOS e no HL foi de $2,43 \pm 0,98$ células IR-FOS. A análise estatística demonstrou diferença significativa entre os animais que receberam o aparelho ortodôntico

com força de 70 gramas por 3 horas ($F_{2,20} = 102,41$, $p < 0,001$ no CEA; $F_{2,20} = 21,02$, $p < 0,001$ no HL, ANOVA) quando comparados ($p < 0,05$, Newman-Keuls) com os animais do grupo controle, que não receberam o aparelho ortodôntico, e os animais que receberam pré-administração de sulfato de morfina. Ainda, os animais do grupo controle apresentaram diferença estatística significativa quando comparados com os animais do grupo que recebeu pré-administração de sulfato de morfina (Figura 11).

A análise histológica demonstrou que nos animais controles o periodonto de sustentação encontra-se íntegro, com fibras colágenas de densidade variável, vascularidade normal e raras imagens indicativas de processo ativo de remodelação óssea (presença de osteoblastos/osteoclastos).

Os animais submetidos às forças ortodônticas exibiram regiões distais do periodonto com presença significativa de osteoclastos, com algumas lacunas de Howship, indicando processo ativo de absorção óssea. Nestes mesmos animais, pôde-se observar uma linha de osteoblastos na superfície do osso alveolar na região mesial do periodonto, sugerindo simultânea aposição de matriz colágena (Figura 12).

O resultado da análise da distalização dos incisivos superiores dos animais demonstrou que nos animais controle a distância entre os incisivos superiores foi em média 0,100 cm. Nos animais que receberam o aparelho ortodôntico com força de 70 gramas por 3, 6, 24 e 48 horas a distância entre os incisivos superiores foi, respectivamente, $1,50 \pm 0,16$ mm; $1,55 \pm 0,08$ mm; $1,70 \pm 0,09$ mm; $1,75 \pm 0,10$ mm. A análise estatística demonstrou diferença significativa entre os animais que receberam o aparelho ortodôntico com 70 gramas de força e os animais controle ($F_{4,19} = 8,60$, $p < 0,001$, ANOVA) (Figura 13).

Figura 6: Fotomicrografias de secções frontais de áreas amigdalóides mostrando células imunorreativas à FOS em animais representativos do grupo manipulado (A), do grupo com aparelho ortodôntico com força de 70 g por 3 horas (B), do grupo com aparelho ortodôntico com força de distalização de 70 g por 6 horas (C), do grupo com aparelho ortodôntico com força de distalização de 70 g por 24 horas (D) e do grupo com aparelho ortodôntico com força de distalização de 70 g por 48 horas (E). TO: trato ótico, CEA: núcleo central da amígdala.

Figura 7: Fotomicrografias de secções frontais de áreas hipotalâmicas mostrando células imunorreativas à FOS em animais representativos do grupo manipulado (A), do grupo com aparelho ortodôntico com força de 70g por 3 horas (B), do grupo com aparelho ortodôntico com força de distalização de 70g por 6 horas (C), do grupo com aparelho ortodôntico com força de distalização de 70g por 24 horas (D) e do grupo com aparelho ortodôntico com força de distalização de 70g por 48 horas (E). FX: fórnix, TO: trato ótico, HL: hipotálamo lateral.

Figura 8: Fotomicrografias de secções frontais de áreas amigdalóides e hipotalâmicas mostrando células imunorreativas à FOS em animais representativos do grupo manipulado (A e B), do grupo com aparelho ortodôntico com força de 70g por 3 horas (C e D) e do grupo que recebeu pré administração de sulfato de morfina 30 minutos antes da movimentação ortodôntica com força de 70g (E e F). TO: trato ótico, FX: fórnix, CEA: núcleo central da amígdala ,HL: hipotálamo lateral.

Figura 9: Densidade de células imunorreativas a proteína FOS (IR-FOS) no núcleo central da amígdala (CEA) após aplicação de força de distalização de 70g nos incisivos superiores de ratos por 3, 6, 24 ou 48 horas. (a) $p < 0,05$, teste Newman-Keuls quando comparados os diferentes tratamentos dentro do mesmo período de tempo; (b) $p < 0,05$, teste Newman-Keuls quando comparados os grupos de 3, 6 e 24 horas com o grupo de 48 horas; (c) $p < 0,05$, teste Newman-Keuls quando comparados os grupos de 3 e 6 horas e o grupo de 24 horas.

Figura 10: Densidade de células imunorreativas a proteína FOS no hipotálamo lateral (HL) após aplicação de força de distalização de 70g nos incisivos superiores de ratos por 3, 6, 24 ou 48 horas. (a) $p < 0,05$, teste Student-Newman-Keuls quando comparados os diferentes tratamentos dentro do mesmo período de tempo; (b) $p < 0,05$, teste Newman-Keuls quando comparados os grupos de 3, 6 e 24 horas com o grupo de 48 horas; (c) $p < 0,05$, teste Newman-Keuls quando comparados o grupo de 6 horas e os grupos de 3 e 24 horas.

Figura 11: Densidade de células imunorreativas a proteína FOS no núcleo central da amígdala (CEA) e no hipotálamo lateral (HL) em animais apenas manipulados, animais submetidos à aplicação de força de distalização de 70g por 3 horas e animais que receberam pré-administração de sulfato de morfina 2 mg/kg e após 30 minutos foram submetidos à movimentação dentária com força de 70g por 3 horas. (a) $p < 0,05$, teste Student-Newman-Keuls quando comparado o grupo 70g com os grupos controle e morfina; (b) $p < 0,05$, teste Newman-Keuls quando comparado o grupo controle e o grupo morfina.

Figura 12: Fotomicrografias de cortes histológicos de regiões periodontal **(A)** Visão panorâmica de periodonto íntegro (região mesial) de animal controle (24 hs): Ligamento periodontal (LP); osso alveolar (AO); tecido dental (D) e cavidade nasal (N). (H.E.; 50x). **(B)** Periodonto de animal controle (24hs). Ligamento periodontal íntegro, conectando tecido dental (D) ao osso alveolar (AO). Imagens similares são encontradas nas regiões mesial e distal (H.E.; 400x). **(C)** Área de tração em periodonto por movimento ortodôntico (região mesial - 70g/48hs). Ligamento periodontal íntegro, conectando tecido dental (D) ao osso alveolar (AO), onde se constitui uma linha de osteoblastos (setas), indicando processo de aposição de matriz colágena (H.E.; 400x). **(D)** Área de compressão em periodonto por movimento ortodôntico (região distal- 70g/48hs). Ligamento periodontal íntegro, conectando tecido dental (D) ao osso alveolar (AO), onde se podem ser observados osteoclastos (seta), indicando processo de absorção óssea (H.E.; 400x).

Figura 13: Distância entre os incisivos superiores de animais controle e animais que receberam aparelho ortodôntico com força de distalização de 70 g por 3, 6, 24 e 48 horas. (*) $p < 0,05$, teste Newman-Keuls quando comparados os animais controle e os animais que receberam o aparelho ortodôntico.

Protocolo Experimental 2: Avaliação do efeito da administração de um inibidor não-seletivo da enzima COX sobre a expressão da proteína FOS após movimentação dentária experimental

Os resultados deste protocolo demonstram que o pré-tratamento com o AINE, diclofenaco de sódio, produziu redução significativa do número de células IR-FOS no CEA e HL (Figura 14). Nos animais que receberam o pré-tratamento com diclofenaco sódio, e após 30 minutos foram submetidos à movimentação ortodôntica, a densidade média de células IR-FOS localizadas no CEA foi de $26,58 \pm 3,93$ células IR-FOS e no HL foi de $21,62 \pm 1,25$ células IR-FOS. Nos animais que receberam injeção prévia de diclofenaco de sódio e foram apenas manipulados com procedimentos semelhantes aos utilizados para colocação do aparelho ortodôntico, a densidade média de células IR-FOS localizadas no CEA foi de $16,54 \pm 1,10$ e no HL foi de $14,72 \pm 1,67$ céls. IR-FOS (Figura 15).

A análise estatística foi feita comparando os animais que receberam o pré-tratamento com diclofenaco de sódio, e que receberam ou não o aparelho ortodôntico, com os animais controle e manipulados no tempo de 6 horas utilizados no protocolo 1. A análise de variância demonstrou diferença significativa entre os tratamentos ($F_{3,26} = 33,95$, $p < 0,001$ no CEA; $F_{3,26} = 33,47$; $p < 0,001$ no HL, ANOVA). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls ($p < 0,05$) evidenciou que há diferença entre os animais que foram submetidos à movimentação dentária por 6 horas que receberam ou não diclofenaco de sódio quando comparados com os animais controle (manipulados e manipulados com administração prévia de diclofenaco). Em adição, estes grupos (70g e Diclo + 70g) diferem entre si. No entanto, não foi evidenciada diferença entre os animais do grupo controle e os animais que receberam pré-administração de diclofenaco de sódio e foram apenas manipulados (Figura 15).

Figura 13: Fotomicrografias de secções frontais de áreas amigdalóides e hipotalâmicas mostrando células imunorreativas à FOS em animais representativos do grupo manipulado (A e B), do grupo com aparelho ortodôntico com força de 70g por 6 horas (C e D), do grupo que recebeu pré administração de diclofenaco de sódio e foi apenas manipulado (E e F) e do grupo que recebeu pré-administração de diclofenaco de sódio 30 minutos antes da movimentação ortodôntica com força de 70g (G e H). TO: trato ótico, FX: fórnix, CEA: núcleo central da amígdala ,HL: hipotálamo lateral.

Figura 8: Densidade de células imunorreativas a proteína FOS no núcleo central da amígdala (CEA) e no hipotálamo lateral (HL) em animais apenas manipulados (CONT), animais submetidos à aplicação de força de distalização de 70g (MD), animais pré-tratados com diclofenaco sódio 5mg/Kg submetidos à aplicação de força de distalização de 70g (DICLO+70g) e aqueles que receberam diclofenaco de sódio e foram apenas manipulados (DICLO+M). (a) $p < 0,05$, teste Newman-Keuls quando comparados os animais que receberam aparelho ortodôntico com força de 70g e os demais grupos; (b) $p < 0,05$, teste Newman-Keuls quando comparados o grupo DICLO+70g e os demais grupos.

DISCUSSÃO

No presente estudo, as células imunorreativas a FOS (IR-FOS) foram encontradas no núcleo central da amígdala (CEA) e no hipotálamo lateral (HL) após 3 e 6 horas de movimentação dentária experimental dos incisivos superiores dos animais com aplicação de uma força de distalização de 70g. Ainda após 24 e 48 horas foi possível encontrar células imunorreativas a FOS em ambas as estruturas estudadas, porém em quantidades menores que após 6 horas. Os animais que foram apenas manipulados sem receber o aparelho ortodôntico apresentaram expressão reduzida de células imunorreativas a FOS.

A observação de células IR-FOS, principalmente em regiões da amígdala, nos animais manipulados possivelmente se deve ao fato de que unidades neuronais do complexo amigdalóide recebem impulsos multimodais periféricos tais como estímulos visuais, táteis e olfativos (KNUEPFER e cols., 1995), e desta maneira, pode ter ocorrido ativação desta estrutura durante os procedimentos iniciais, tais como durante a manipulação bucal dos animais. Corroborando nossos achados, estudo prévio de Hiroshima e cols. (2001) demonstrou que podem ocorrer poucas células imunorreativas a FOS no núcleo parabraquial após a simples manipulação durante 1 a 2 minutos da região orofacial de ratos, com procedimentos semelhantes aos realizados para a inserção de um elástico na região dos molares, procedimento este utilizado para a movimentação dentária experimental. Vale ressaltar que, o número de células imunorreáticas à proteína FOS nos animais manipulados foi bem menor do que o obtido com os grupos experimentais submetidos à movimentação dentária com força de distalização de 70g por 3, 6, 24 ou 48 horas.

Possivelmente, nos grupos experimentais, onde os animais receberam o aparelho ortodôntico ativado com 70g de força, a movimentação dentária experimental produziu

ativação nociceptiva, a qual é capaz de promover a ativação da proteína FOS em áreas do complexo trigeminal (FUJYOSHI e cols., 2000; KATO e cols., 1994) como também em outras estruturas do sistema nervoso central (YAMASHIRO e cols., 1997; MAGDALENA e cols., 2004), relacionadas com a modulação da informação nociceptiva, em particular em áreas do complexo amigdalóide e do hipotálamo (YAMASHIRO e cols., 1998). Esta sensação de dor é conduzida por fibras nervosas amielinizadas que inervam a polpa e o ligamento periodontal, cujos corpos neuronais encontram-se no gânglio trigeminal e também no núcleo mesencefálico do complexo trigeminal (MARFURT e TURNER, 1984). Quando uma força ortodôntica é aplicada por um período prolongado há a instalação de um processo inflamatório no periodonto, com a liberação de prostaglandinas E_2 . A liberação desse mediador atinge um pico de 24 a 48 horas após a aplicação da força ortodôntica (GRIEVE e cols., 1994). É possível que devido a esse processo inflamatório ocorra recrutamento de maior número de células imunorreativas a FOS e maior sensibilidade dolorosa algumas horas após a aplicação da força ortodôntica. Segundo Iwata e cols. (1997) os neurônios nociceptivos das lâminas superficiais (I e II) do núcleo espinhal do trigêmio (subnúcleo caudal) e do primeiro segmento (C1) da medula espinhal transmitem a informação nociceptiva das regiões orofaciais para outras regiões do sistema nervoso central, sendo, portanto, estas estruturas a primeira estação sináptica da informação nociceptiva da cavidade bucal e da face.

Estudos de Yamashiro e cols. (1997) demonstraram que a movimentação dentária experimental em molares de ratos induziu imunorreatividade à proteína FOS no núcleo espinhal do trigêmio, subnúcleo caudal ipsilateralmente e no núcleo parabraquial lateral bilateralmente. Em adição, Yamashiro e cols. (1998) mostraram células imunorreativas à proteína FOS em núcleos hipotalâmicos e talâmicos, e também no

núcleo central da amígdala após movimentação dentária experimental em ratos. Nesta mesma linha de investigação, utilizando força controlada para promover movimentação dentária, porém estudando outras áreas do sistema nervoso central, Magdalena e cols. (2003) demonstraram que a movimentação dentária experimental, em incisivos centrais superiores induziu expressão de *c-fos* bilateralmente no núcleo dorsal da rafe, na substância cinzenta periaquedutal, e no locus coeruleus, além de células FOS imunorreativas no subnúcleo caudal e interpolar do núcleo espinhal do trigêmio e no núcleo parabraquial.

Em nosso estudo, podemos aceitar a possibilidade de que a presença de células imunorreativas a FOS no núcleo central da amígdala e no hipotálamo lateral deve-se a transmissão da informação nociceptiva por meio da vias espino(trigêmio)pontoamigdalóide (BERNARD e cols., 1989), espino(trigêmio)parabraquiohipotalâmica (BESTER e cols., 1995) e espinohipotalâmica (GIESLER, 1995 b). Essas vias que se iniciam, principalmente, nas lâminas I e V do corno dorsal da medula espinhal, ou então, no núcleo espinhal do trigêmio alcançam, principalmente, a parte lateral da área parabraquial. Por sua vez, a área parabraquial retransmite essas informações nociceptivas para a amígdala e para o hipotálamo. De fato, trabalho de Hermanson e Blomqvist (1997b) em que se avalia a expressão de FOS em estruturas neurais após aplicação de um estímulo nocivo orofacial (injeção de paraformaldeído 1,85% na região do lábio superior de ratos) mostra que a região lateral externa da parabraquial (Pbel) recebe grande parte da informação nociceptiva do núcleo espinhal do trigêmio. Por sua vez a Pbel é a origem principal de eferências para o CEA (Bernard e cols., 1989; Bernard e cols., 1993; Ma e Peschanski, 1988).

Em adição, estudos anatômicos demonstraram que apesar dos neurônios do núcleo parabraquial pontino fazerem sinapse, principalmente, no núcleo central da

amígdala, esses axônios têm colaterais dirigidos para o tálamo e hipotálamo. A informação nociceptiva é transmitida por meio dessa via, denominada espino(trigêmio)parabraquiohipotalâmica (BESTER e cols., 1995). Assim, da mesma forma que a via espino(trigêmio)pontoamigdalóide, esta via com participação hipotalâmica está envolvida em reações afetivas-motivacionais, comportamentais e autonômicas ao estímulo nocivo (BERNARD e cols., 1993; BESTER e cols., 1995). Estudo de Joviliano (2006) demonstrou aumento da expressão da proteína FOS no núcleo parabraquial após 24 horas de movimentação dentária experimental, corroborando, dessa forma, com nossos achados que demonstram que após 24 horas de movimentação dentária a expressão de FOS no CEA e no HL continua elevada.

Outra proposta plausível seria considerar que o estímulo nociceptivo é capaz de ativar vias descendentes monoaminérgicas de controle nociceptivo (BASBAUM & FIELDS, 1984). Dentro desta perspectiva, a movimentação dentária é capaz de promover aumento da liberação de serotonina bem como dos níveis de seus metabólitos (5-HIAA) nas regiões bulbares e na região da substância cinzenta periaquedutal (YAMASHIRO e cols., 2001). Ainda Magdalena e cols. (2004) demonstrou que a movimentação dentária de incisivos em ratos é capaz de induzir marcação para proteína FOS no núcleo dorsal da rafe. Estudo anatômico mostra que as regiões do núcleo central da amígdala e do hipotálamo lateral recebem intensa inervação serotoninérgica do núcleo dorsal da rafe (PEYRON e cols., 1998). Desta maneira, é possível aventar a possibilidade de que a imunorreatividade à proteína FOS observada em nossos experimentos possa ser devido à ativação das vias serotoninérgicas de modulação nociceptivas.

Os resultados obtidos com a administração de diclofenaco de sódio 30 minutos antes da movimentação dentária experimental demonstram que a pré-administração deste

antiinflamatório não-estereoidal promoveu redução da imunorreatividade à proteína FOS, demonstrando que seu uso pode ser capaz de reduzir a ativação de estruturas encefálicas relacionadas com o componente afetivo-motivacional da dor. De acordo com Furstman e Bernik (1972) a dor ocasionada pelo o tratamento ortodôntico resulta da combinação de pressão, isquemia, inflamação e edema gerados no periodonto durante a aplicação de forças. Os estágios iniciais do tratamento ortodôntico envolvem uma resposta inflamatória com a presença de vasodilatação periodontal e tendência à dor. Essa natureza inflamatória da dor faz dos AINES uma boa escolha para o controle da dor de origem ortodôntica (DAVIDOVITGH e SHANFIELD; 1986).

O uso do AINES diclofenaco de sódio em os nossos experimentos atuou de modo a minimizando os processos inflamatórios inibindo cicloxigenases, principalmente a responsável pela síntese de prostanoídes, assim evitando, por exemplo, o excesso de prostaglandinas. Esta redução do processo inflamatório foi capaz de diminuir a expressão da proteína FOS no CEA e no HL, demonstrando que possivelmente parte das células ativadas nessas estruturas pela movimentação dentária experimental seja devido ao processo inflamatório decorrente da aplicação de força para distalização dos incisivos centrais superiores.

Entretanto, podemos aventar a possibilidade de que a não inibição total da expressão proteína FOS nas estruturas estudadas deve-se ao fato deste fármaco atuar somente no processo fisiopatológico periférico da inflamação, não produzindo alteração no componente afetivo-motivacional da dor. Desta maneira, podemos supor que a marcação encontrada em nossos resultados possa ser resultante, em parte, da participação do núcleo central da amígdala e do hipotálamo lateral na modulação emocional da dor decorrente da movimentação dentária experimental.

Dando suporte aos nossos resultados, Yamashiro e cols. (1997) demonstraram que a movimentação dentária experimental em molares de ratos induziu imunorreatividade à proteína FOS no núcleo espinhal do trigêmio, subnúcleo caudal ipsilateralmente e no núcleo parabraquial lateral bilateralmente, área de projeção para o núcleo central da amígdala e para o hipotálamo lateral. Em adição, foi demonstrado o aumento de células IR-FOS em áreas talâmicas, hipotalâmicas e também no núcleo central da amígdala 24 horas após a movimentação dentária experimental de molares. Possivelmente parte desta ativação é decorrente da instalação de um processo inflamatório no periodonto (FURSTMAN e BERNIK, 1972).

Nossos resultados demonstram também que a administração de sulfato de morfina, um potente analgésico de ação central, foi capaz de inibir totalmente a imunorreatividade à proteína FOS no núcleo central da amígdala e no hipotálamo lateral. Estes dados demonstram que a ativação destas estruturas em estudo, decorre não apenas do processo inflamatório local proveniente da movimentação dentária, mas também do processamento emocional da informação nociceptiva. Corroborando com nossos achados, estudo de Aihara e cols. (1998), mostrou que a pré-administração de morfina 3 ou 10 mg/kg i.p., 2 horas antes da inserção de um elástico entre o primeiro e segundo molares superiores para realizar a movimentação dentária reduziu significativamente o número de células imunorreativas à FOS no subnúcleo caudal do núcleo espinhal do trigêmio 2 horas após a movimentação dentária quando comparado com os animais do grupo controle. Essa redução sugere que a expressão de FOS após movimentação dentária possa ser devido à transmissão da informação nociceptiva, desde que a morfina é um potente analgésico de ação central (MANNING e MAYER, 1995) e periférica (WENK e cols., 2006).

A movimentação dentária, utilizada em nossos experimentos promove ativação das vias nociceptivas por ser um estímulo nocivo, bem como por ser acompanhada por uma resposta inflamatória dos tecidos periodontais de sustentação e do periodonto de revestimento. Esta inflamação acarreta a sensibilidade dolorosa, levando ao desconforto do tratamento ortodôntico e por vez ao insucesso do tratamento pela falta de cooperação dos pacientes. Assim, é de suma importância o estudo de medidas terapêuticas medicamentosas para a correta e controlada reparação tecidual e a melhor participação do paciente no tratamento.

Em resumo, nossos resultados demonstram o envolvimento da amígdala e do hipotálamo nas vias neurais ativadas pela movimentação dentária. Especificamente há aumento da imunorreatividade à proteína FOS no CEA e no HL 3, 6 e 24 horas após o início da movimentação dentária experimental. Estes achados são semelhantes aos relatos clínicos de dor após a aplicação de força para movimentação em que os pacientes descrevem um pico inicial de dor seguido por um segundo pico um ou dois dias após (JONES e cols., 1992).

Nossos resultados também demonstram que o uso do AINE diclofenaco de sódio pode ser eficiente na redução da sintomatologia dolorosa decorrente da movimentação ortodôntica, evidenciado pela redução da IR-FOS nas áreas estudadas. Dessa forma, podemos sugerir que a ativação de células nas estruturas em estudo se deva, em parte, à instalação de um processo inflamatório no periodonto em consequência da aplicação de forças ortodônticas.

CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que a movimentação dentária experimental com força de 70 gramas foi capaz de promover aumento da expressão da proteína FOS no núcleo central da amígdala e no hipotálamo lateral após 3, 6 e 24 horas de movimentação ortodôntica.

A pré-administração de sulfato de morfina (2 mg/kg) capaz de inibir a expressão da proteína FOS no CEA e no HL quando comparado com os animais controle e os animais submetidos à movimentação ortodôntica com força de 70 gramas por 3 horas. Essa inibição sugere que a expressão de FOS após movimentação dentária possa ser devido à transmissão da informação nociceptiva, desde que a morfina é um potente analgésico de ação central e periférica.

O pré-tratamento com diclofenaco de sódio (5mg/kg) reduziu a imunorreatividade a proteína FOS no núcleo central da amígdala e no hipotálamo lateral em relação aos animais que receberam o aparelho ortodôntico com força de distalização com força de 70 gramas por 6 horas. A redução do processo inflamatório foi capaz de diminuir a expressão da proteína FOS no CEA e no HL, demonstrando que possivelmente parte das células ativadas nessas estruturas pela movimentação dentária experimental seja devido ao processo inflamatório decorrente da aplicação de força para distalização dos incisivos centrais superiores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIHARA, Y.; MAEDA, T.; HANADA, K.; WAKISAKA, S. Effects of morphine on the distribution of FOS protein in the trigeminal subnucleus caudalis neurons during experimental tooth movement of rat molar. *Brain Res.*, 819: 48-57, 1998.
- AMARAL, D. Memory: anatomical organization of candidate brain regions In: *Handbook of Physiology*. Sect.1: Neurophysiology, Vol 5: Higher Function of the brain, F. Plum. Ed. Pp. 211-294, American Physiological Society, Bethesda, MD, 1987.
- ARBEX, S.T.; WASSALL, T.; NUNES E. L. Avaliação comparativa do Nimesulide versus Naproxeno no tratamento da dor pós-cirurgia oral. *Rev. Bras. Odontol.*; 49: 15-8, 1992.
- ARIAS, O.R.; MARQUEZ-OROZCO, M.C. Aspirin, acetaminophen and ibuprofen: Their affects on orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*; 130: 364-370, 2006.
- ARMSTRONG, R.C.; MONTIMINY, M.R. Transsynaptic control of gene expression. *Ann. Rev. Neurosci.*, 6: 17-29, 1993.
- BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Ann. Rev. Neurosci.*, 7: 309-338, 1984.
- BERNARD, J.-F.; BESSON, J.-M. The spino(trigemio)pontoamygdaloid pathway: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J. Neurophysiol.*, 63: 473-490, 1990.
- BERNARD J.F.; ALDEN M.; BESSON, J.M. The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 329(2):201-229, 1993.
- BERNARD, J.F.; PESCHANSKI, M.; BESSON, J.M. A possible spino(trigemino)pontoamygdaloid pathways for pain. *Neurosci. Lett.*, 100: 83-88, 1989.

- BESTER, H.; MENENDEZ, L.; BESSON, J.M.; BERNARD, J.F. The spino(trigemino)parabrachiohypothalamic pathways: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J. Neurophysiol.*, 73: 568-585, 1995.
- BISHOP, J.M. Viral oncogenes. *Cell*, 42 (1): 23-38 1985.
- BRAIN, S.D.; WILLIAMS, T.J ; TIPPINS, J.R.;MORRIS, H.R.;MACINTNTYRE,I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilatador. *Nature*, 313: 54-56, 1985.
- BRODAL, A. As vias olfatórias. A amígdala. O hipotálamo. O sistema límbico. Em: Anatomia Neurológica com correlações clínicas. Livraria Roca (editora). Brasil, 515-562, 1984.
- BULLIT, E. Expression of c-fos like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J. Com.p Neurol.*, 22: 517-530, 1990.
- BYERS, M.R.; WESTRUM, L.E.; DONG, W.K.; IADAROLA, M.J. C-fos and silver degeneration reactions in adult rat brain stem following acute and chronic dental inflammation. Soc. Neuroci. Abstrac., 16: 1164, 1990.
- CAMPEAU, S.; FALLS, W.A.; CULLINAN, W.E.; HELMREICH, D.L.; DAVIS, M.; WATSON, S.J. Elicitation and reduction of fear: behavioral and neuroendocrine indices and brain induction of immediate-early gene c-fos. *Neuroscience*, 78(4): 1087-1104, 1997.
- CECHETTO, D.F.; STANDAERT, D.G.; SAPER, C.B. Spinal and trigeminal dorsal horn projections to the parabrachial nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 240: 153-160, 1985.
- CHUMBLEY, A.B.; TUNCAY, O.C. The effect of indomethacin (an aspirin-like drug) on the rate of orthodontic tooth movement. *Am. J. Orthod.*, 89: 312-314, 1986.
- CURRAN, T.; MILLER, A.D.; ZOKAS, L.; VERMA, I.L. Viral and cellular fos proteins: a comparative anlyses. *Cell*, 36(2): 259-268, 1984.
- CURRAN, T.; MORGAN, J.I. Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *J Neurobiol.*, 26 (3): 403-412, 1995.

- DAFNY, N.; DONG, W.Q.; PRIETO-GOMEZ, C.; REYES-VAZQUEZ, J.; STANFORD, J.; QUIAO, J.T. Lateral hypothalamus: site involved in pain modulation. *Neuroscience*, 70: 449-460, 1996
- DAVIDOVITCH, Z; SHANFIELD, J. Biochemical aspects of orthodontic tooth movement: cyclic nucleotide and prostaglandin concentrations in tissues surrounding orthodontically treated teeth in vivo. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, 90: 139-148, 1986.
- DINARELLO, CA. Biology of interleukin – 1. *FASEB J.*, 2: 108-15, 1988.
- FELDMAN, R.S.; MEYER, J.S.; QUENZER, L.F.; Synaptic structure and function. In: FELDMAN, R.S.; MEYER, J.S.; QUENZER, L.F. (eds), *Principle of Neuropsychopharmacology*. 1st ed., Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, 1997.
- FOX, R.J.; SORENSON, C.A. Bilateral lesions in amygdala attenuate analgesia induced by diverse environmental challenges. *Brain Res.* 648: 215-221, 1994.
- FREITAS, J.R. *Terapêutica Odontológica: farmacologia / Dentistry therapeutic: pharmacology*. Rio de Janeiro; Pedro Primeiro; 1997. 281p.
- FUJIYOSHI, F.; YAMASHIRO, T.; DEGUCHI, T.; SUGIMOTO, T.; TAKANO-YAMAMOTO, T. The difference in temporal distribution of c-Fos immunoreactive neurons between the medullary dorsal horn and the trigeminal subnucleus oralis in the rat following experimental tooth movement. *Neurosci. Lett.*, 283: 205-208, 2000.
- FURSTMAN, I; BERNIK, S. Clinical considerations of the periodontium. *Am. J. Orthod.*, 61: 138-155, 1972.
- GENTZ, R.; RAUSCHER, F.J.3RD.; ABATE, C.; CURRAN, T. Parallel association of FOS and JUN leucine zippers juxtaposes DNA binding domains. *Science*, 31(4899): 1695-1699, 1989.
- GIESLER, G.J. Evidence for direct nociceptive projections from the spinal cord to the hypothalamus and telencephalon. *Neuroscience*, 7: 253-261, 1995a.
- GIESLER, G.J. The spino-hypothalamic tract. In: *Forebrain areas involved in pain processing*. Besson, J-M; Guilbaud, G and Ollat, H (Eds.). Paris: Eurotext, 13-25, 1995b.

- GRIEVE III, W.G.; JOHNSON, G.K.; MOORE, R.N.; REINHARDT, R.A.; DUBOIS, L.M. Prostaglandin E (PGE) and interleukin - 1 β (IL 1 β) levels in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, 105; 369-74, 1994.
- GROSSMAN, S.P. Behavioral effects of chemical stimulation of the ventral amygdala. *J Comp Physiol Psychol.*, 57: 29-36, 1964.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 10° ed. Guanabara Koogan, 2002.
- HELMSTETTER, F.J. The amygdala is essential for the expression of conditional hypoalgesia. *Behav. Neurosci.*, 106: 518-528, 1992.
- HELMSTETTER, F.J.; BELLGOWAN, P.S. Lesions of amygdala block conditional hypoalgesia on the tail flick test. *Brain Res.*, 612: 253-257, 1993.
- HERDEGEN, T.; LEAH, J.D. Inducible and constructive transcriptions factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res. Rev.*, 28: 370-490, 1998.
- HERMANSON, O.; BLOMQVIST, A. Differential expression of the AP-1/CRE-binding site proteins FOS and CREB in preproenkephalin mRNA-expressing neurons of the rat parabrachial nucleus after nociceptive stimulation. *Mol. Brain Res.*, 51: 188-196, 1997a.
- HERMANSON, O.; BLOMQVIST, A. Subnuclear localization of FOS-like immunoreactivity in the rat parabrachial nucleus after nociceptive stimulation. *J. Comp. Neurol.*, 368: 45-56, 1997b.
- HOLDEN, J.E.; NALEWAY, E. Microinjection of carbachol in the lateral hypothalamus produces opposing actions on nociception mediated by α_1 and α_2 adrenoceptors. *Brain Res.*, 911: 27-36, 2001
- HUNT, S.P.; PINI, A.; EVAN, G. Induction of c-fos like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 328: 632-634, 1987.

- ISHIDA-YAMAMOTO, A. & TOHYAMA, M. Calcitonin gene-related peptide in the nervous tissue. *Prog. Neurobiol.*, 33: 335–386, 1989.
- IWATA, K.; TAKAHASHI, O.; OCHIAI, H.; HIBIYA, J.; SAKAKI, T.; YAMAGUCHI, Y.; SUMINO, R. FOS protein induction in the medullary dorsal horn and first segment spinal cord by tooth-pulp stimulation in cats. *Pain*, 75: 27-36, 1998.
- JIANG, M.; BEHBEHANI, M.M. Physiological characteristics of the projection pathway from the medial preoptic to the nucleus raphe magnus of the rat and its modulation by the periaqueductal gray. *Pain*, 94: 147-1369, 2001.
- JONES, M.L.; ORTH, D.; CHAN, C. The pain and discomfort experienced during orthodontic treatment: a randomizing controlled clinical trial of two initial aligning arch wires. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, 102: 373-381, 1992.
- JOVILIANO, P. **Expressão temporo-espacial de c-fos em estruturas cerebrais relacionadas com a nocicepção e antinocicepção durante movimentação dos incisivos superiores de ratos.** Ribeirão Preto, 2006. 41p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- KATO, J.; WAKISAKA, S.; TABATA, M.J.; SASAKI, Y.; KURISU, K. Induction of FOS protein in the rat trigeminal nucleus complex during an experimental tooth movement. *Arch. Oral Biol.*, 39: 723-726, 1994.
- KAPP, E. S.; GALLAGHER, M. M.; FRYSSINGER, R. S.; APPLGATE, C. D. The amygdale, emotion and cardiovascular conditioning. In: *The Amygdaloid Complex*, Ben-Ari (ed.). Amsterdam: Elsevier/North-Holland. 355-366, 1981.
- KAVAM, E.; GJERDET, N.R.; BONDEVIK, O. Traumatic ulcers and pain in adults during orthodontic treatment. *Comm. Dent Oral Epidemiol.*, 15: 104-107, 1987.
- KING, G.J.; KEELING, S.D.; WRONSKI, T.J. Histomorphometric study of alveolar bone turnover in orthodontic tooth movement. *Bone*, 12: 401-409, 1991.
- KNUEPFER, M.M.; EISMAN, A.; SCHÜTZE, I.; STUMPF, H.; STOCK, G. Responses of single neurons in amygdale to interoceptive and exteroceptive stimuli in conscious cats. *Am. Physiol. Soc.*, R666-R675, 1995.

- LANDSCHULZ, W.H.; JOHNSON, P.F.; MCKNIGHT, S.L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 24(4860): 1759-1764, 1988.
- LE J, VILCEK J Biology of disease: tumor necrosis factor and interleukin 1; cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab. Invest.*, 56: 234-48, 1987.
- LEDOUX, J.E.; IWATA, I.; CICCHETTI, P.; REIS, D.J. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J. Neurosci.*, 8: 2517-2529, 1988.
- LEITE-PANISSI, C.R.A.; MONASSI, C.R.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Role of the amygdaloid nuclei in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. *Physiol. Behav.*, 67: 717-724, 1999.
- LEITE-PANISSI, C.R.A.; COIMBRA, C.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. The cholinergic stimulation of the central amygdala modifying the tonic immobility response and antinociception in guinea pigs depends on the ventrolateral periaqueductal gray. *Brain Res. Bull.*, 60: 167-178, 2003.
- LEITE-PANISSI, C.R.A.; BRENTAGANI, M.R.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Cholinergic-opioidergic interaction in the central amygdala induces antinociception in the guinea pig. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 37: 1571-1579, 2004.
- LEW, K.K. Attitudes and perception of adults towards orthodontic treatment in an Asian community. *Comm. Dent. Oral Epidemiol.*, 21: 31-35, 1993.
- LIM, H.M.; LEW, K.K.; TAY, D.K.L. A clinical investigation of the efficacy of low level laser therapy in reducing orthodontic post adjustment pain. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, 108: 614-622, 1995.
- LITTON, S F. Tooth movement during ascorbic acid deficiency. *Am. J. Orthod.*, 65: 290-302, 1974.
- LUMB, B.M. Hypothalamic influences on viscerosomatic neurons in the lower thoracic spinal cord of the anaesthetized rat. *J. Physiol.*, 424: 427-444, 1990.

- MA, W.; PESCHANSKI, M. Spinal and trigeminal projections to the parabrachial nucleus in the rat: electron-microscopic evidence of a spino-ponto-amygdalian somatosensory pathway. *Somatos. Res.*, 5: 247-257, 1988.
- MAGDALENA, C.M.; NAVARRO, V.P.; PARK, D.M.; STUANI, M.B.S.; ROCHA, M.J.A. c-fos expression in rat brain nuclei following incisor tooth movement, *J. Dent. Res.* 83(1): 50-54, 2004.
- MANNING, B.H.; MAYER, D.J. The central nucleus of the amygdale contributes to the production of morphine antinociception in the formalin test. *J. Neurosci.*, 15(12), 8199-8213, 1995.
- MARFURT, C.F. & TURNER, D.F. The central projections of tooth pulp afferent in the rat as determined by the transganglionic transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.*, 223: 535-547, 1984.
- MARIE, S.S.; POWWERS, M.; SHERIDAN, J.J. Vibratory stimulation as a method of reducing pain after orthodontic appliance adjustment. *J. Clin. Orthod.*, 37: 205-208, 2003.
- MATSUMURA, K.; KOBAYASHI, S. Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells. *Front. Biosci.*, 9: 2819-2826, 2004.
- MEADE, E.A.; SMITH, W.L.; DE WINTT D.L. Differencial inhibition of. Prostaglandin endoperoxide synthase (Cyclooxygenase) isoenzymes by aspirin and other non-steroidal anti- inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.*, 268: 6610-6614, 1993.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.*, 57: 1-164, 1999.
- MITCHELL, J.A.; AKARASEREEMONT, P.; THIEMERMANN, C.; FLOWER, R.J.; VANE, J.R. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 11693-11697, 1993.
- MORGAN, J.I.; CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Ann. Rev. Neurosci.*, 14: 421-451, 1991.
- MORSE, A. Formic acid-sodium citrate descalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. *J. Dent. Res.*, 24: 143-153, 1945.

- NAGAN, P.; WILSON, S.; SHANFELD, J.; AMINI, H. The effect of ibuprofen on the level of discomfort in patients undergoing orthodontic treatment. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, 106: 88-95, 1994.
- NOVAES, A.P.R.; ROCHA, M.J.A.; LEITE-PANISSI, C.R.A. Activation of the forebrain following incisor tooth movement in rats, em preparação, 2008.
- PECK, R. Neuropeptides modulating macrophage function. *Ann. NY Acad. Sci.*, 496: 264-270, 1987.
- PEYRON, C.; PETIT, J.-M.; RAMPON, C.; JOUVET, M.; LUPPI, P.-H. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience*, 82: 443-468, 1998.
- PITKÄNEN, A.; SAVANDER, V.; LEDOUX, J. E. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci.*, 20: 517-523, 1997.
- POLAT, O.; KARAMAN, A.I. Pain control during fixed orthodontic appliance therapy. *Angle Orthod.*, 75: 210-215, 2005.
- POWELL, K.J.; ABUL-HUSN, N.S.; JHAMANDAS, A.; OLMSTEAD, M.C.; BENINGER, R.J.; JHAMANDAS, K. Paradoxical effects of the opioid antagonist naltrexone on morphine analgesia, tolerance and reward in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 300: 588-596, 2002.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, I.M. *Farmacologia*. 3° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997. 691 p.
- RAUSCHER, F.J.3RD.; VOULALAS, P.J.; FRANZA, B.R.; CURRAN, T. Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes & Development*, 2: 1687-1699, 1988.
- REBORIÇAS, E.C.C.; SEZALO, E.N.; KISHI, C.; FREITAS, R.L.; SAVOLDI, M.; MORATO, S.; COIMBRA, N.C. Effect of the blockade of μ 1-opioid and 5HT2A-serotonergic/21-

- noradrenergic receptors on sweet-substance-induced analgesia. *Psychopharmacol. (Berl)*, 179: 349-355, 2005.
- RODGERS, R.J. Influence of intra-amygdaloid opiate injections on shock thresholds, tail-flick latencies and open field behavior in rats. *Brain Res.*, 153: 211-216, 1978.
- ROTH, P.M.; THRASH, W.J. Effects of transcutaneous electrical nerve stimulation for controlling pain associated with orthodontic tooth movement. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, 90: 132-138, 1986.
- SAITO, I.; ISHII, K.; HANADA, K.; SATO, O.; MAEDA, T. Responses of calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerve fibres in the periodontal ligament of rat molars to experimental tooth movement. *Arch. Oral Biol.*, 36: 689-692, 1991.
- SANDY, J.R.; HARRIS, M. Prostaglandins and tooth movement. *Eur. J. Orthod.*, 6: 175-182, 1984.
- SAYAGO, E.M. Emprego de antiinflamatórios nas cirurgias parodontodônticas. *Revista da APCD*. São Paulo: v.48, n.6, nov./dez. 1994.
- SCHUTZ, A.B.; TAGA, E.M.; CONSOLARO, A.; GUIMARÃES, S.A.C. Estudo comparativo dos efeitos biológicos do Tenoxicam, Indometacina, Dexametasona e Metotrexato em granulomas induzidos pela placa microbiana dental. *Revista Faculdade de Odontologia Bauru*, 5: 1-8, 1997.
- STOREY, E. Bone changes associated with tooth movement. *Aust J Dent.*; 59: 147-161, 1955.
- STOREY, E. The nature of tooth movement. *Am J Orthod.*, 63: 292-314, 1973.
- SUKRITI, HOTA, D.; PANDHI, P. Potentiation of antihyperalgesic activity of diclofenac by nimodipine in a formalin model of facial pain in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.*, 26(4): 253-6, 2004.
- SWANSON, L.W. *Brain Maps: Structure of the rat brain*. Elsevier: The Netherlands, 1992.
- URSIN, H.; JELLESTAD, F.; CABRERA, I. G. The amygdale exploration and fear In: The Amygdaloid Complex, edited by Ben-Ari. Amsterdam: *Elsevier/North-Holland*. 1981, pp. 317-329.

- VANDEVSKA-RADUNOVIC, V. Neural modulation of inflammatory reactions in dental tissue incident to orthodontic tooth movement. A review of the literature. *Eur. J. Orthod.*, 21: 231-247, 1999.
- WALDO, C.M. Method for the study of tissue responses to tooth movement. *J. Dent. Res.*, 32: 690-691, 1953.
- WAKISAKA, S.; SASAKI, Y.; ICHIKAWA, H.; MATSUO, S. Increase in c-fos like immunoreactivity in the trigeminal nucleus complex after dental treatment. *Proc. Finn. Dent. Soc.*, 88(Suppl.): 551-555, 1992.
- WATKINS, L.R.; WIERTELAK, E.P.; MAIER, S.F. The amygdala is necessary for the expression of conditioned but not unconditioned analgesia. *Behav. Neurosci.*, 107: 402-405, 1993.
- WEISS, D.D.; CARVER, D.M. Transcutaneous electrical neural stimulation for pain control. *J. Clin. Orthod.*, 28: 670-671, 1994.
- WENK, H.N.; BREDERSON, J.D.; HONDA, C.N. Morphine directly inhibits nociceptors in inflamed skin. *J. Neurophysiol.*, 95: 2083-2097, 2006.
- WORKMAN, B.J.; LUMB, B.M. Inhibitory effects evoked from the anterior hypothalamus are selective for the nociceptive responses of dorsal horn neurons with high and low threshold inputs. *J. Neurophysiol.*, 77: 1583-2831, 1997.
- YAMASAKI K , SHIBATA Y , IMAI S , TANI Y , SHIBASAKI Y , FUKUHARA T. Clinical application of prostaglandina E1 (PGE1) upon orthodontic tooth movement. *Am. J. Orthod.*, 85: 508-518, 1984.
- YAMASHIRO, T.; FUKUNAGA, T.; KABUTO, H.; OGAWA, N.; TAKANO-YAMAMOTO, T. Activation of the bulbospinal serotonergic system during experimental tooth movement in the rat. *J. Dent. Res.*, 80: 1854-1857, 2001
- YAMASHIRO, T.; NAKAGAWA, K.; SATOH, K.; MORIYAMA, H.; TAKADA, K. c-fos expression in the trigeminal sensory complex and pontine parabrachial areas following experimental movement. *Neuroreport*, 8: 2351-2353, 1997.

- YAMASHIRO, T.; SATOH, K.; NAKAGAWA, K.; MORIYAMA, H.; YAGI, T.; TAKADA, K. Expression of Fos in the rat forebrain following experimental tooth movement. *J. Dent. Res.*, 77: 1920-1925, 1998.
- ZIGMOND, M.J.; BLOMM, F.E.; LANDIS, S.C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, 1999.

APÊNDICE

<i>Número de células imuno-reativas a FOS</i>		
<i>Grupo manipulado 3 h</i>		
Animal	CEA	Densidade
1	28,75	11,03
2	22	8,44
3	20,5	7,87
4	15	5,76
5	16	6,14
6	27	10,36
7	35,5	13,63
8	26	9,98

Tabela I: Número total e densidade de células imuno-reativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no núcleo central da amígdala (CEA; n = 8) em animais que foram apenas manipulados e perfundidos após 3 horas.

<i>Número de células imuno-reativas a FOS</i>		
<i>Grupo manipulado 6 h</i>		
Animal	CEA	Densidade
1	24	9,21
2	42	16,12
3	44,25	16,98
4	44	16,89
5	39,33	15,10
6	25,66	9,85
7	26	9,98
8	52	19,96

Tabela II: Número total e densidade de células imuno-reativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no núcleo central da amígdala (CEA; n = 8) em animais que foram apenas manipulados e perfundidos após 6 horas.

<i>Número de células imuno-reativas a FOS</i>		
<i>Grupo manipulado 24 h</i>		
Animal	CEA	Densidade
1	26	9,98
2	17	6,52
3	19,33	7,42
4	23,5	9,02
5	24,33	9,34
6	29	11,13
7	32,66	12,54
8	19,66	7,55
9	14,66	5,63

Tabela III: Número total e densidade de células imuno-reativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no núcleo central da amígdala (CEA; n = 9) em animais que foram apenas manipulados e perfundidos após 24 horas.

<i>Número de células imuno-reativas a FOS</i>		
<i>Grupo manipulado 48 h</i>		
Animal	CEA	Densidade
1	0	0,00
2	16,3	6,26
3	16,5	6,33
4	13,33	5,12
5	14	5,37
6	29,5	11,32
7	40	15,35
8	34	13,05

Tabela IV: Número total e densidade de células imuno-reativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no núcleo central da amígdala (CEA; n = 8) em animais que foram apenas manipulados e perfundidos após 48 horas.

<i>Número de células imuno-reativas a FOS</i>		
<i>Grupo manipulado 3 h</i>		
Animal	HL	Densidade
1	39	9,04
2	28	6,49
3	41,33	9,58
4	42	9,73
5	43	9,97
6	24,5	5,68
7	51	11,82
8	21	4,87

Tabela V: Número total e densidade de células imuno-reativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no hipotálamo lateral (HL; n = 8) em animais que foram apenas manipulados e perfundidos após 3 horas.

<i>Número de células imuno-reativas a FOS</i>		
<i>Grupo manipulado 6 h</i>		
Animal	HL	Densidade
1	68	15,76
2	55,5	12,86
3	82	19,01
4	73	16,92
5	75,5	17,50
6	59,66	13,83
7	39,33	9,12
8	31,5	7,30

Tabela VI: Número total e densidade de células imuno-reativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no hipotálamo lateral (HL; n = 8) em animais que foram apenas manipulados e perfundidos após 6 horas.

<i>Número de células imuno-reativas a FOS</i>		
<i>Grupo manipulado 24 h</i>		
Animal	HL	Densidade
1	95	22,02
2	90,33	20,94
3	38,66	8,96
4	24	5,56
5	27,66	6,41
6	27	6,26
7	69	15,99
8	77	17,85
9	76,75	17,79

Tabela VII: Número total e densidade de células imuno-reativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no hipotálamo lateral (HL; n = 8) em animais que foram apenas manipulados e perfundidos após 24 horas.

<i>Número de células imuno-reativas a FOS</i>		
<i>Grupo manipulado 48 h</i>		
Animal	HL	Densidade
1	2	0,46
2	41,33	9,58
3	38,5	8,92
4	25,66	5,95
5	44	10,20
6	21,5	4,98
7	38,5	8,92
8	33,5	7,76

Tabela VIII: Número total e densidade de células imuno-reativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no hipotálamo lateral (HL; n = 8) em animais que foram apenas manipulados e perfundidos após 48 horas.

<i>Número de células imuno-reativas a FOS</i>		
<i>Grupo 70 g 3 h</i>		
Animal	CEA	Densidade
1	79,5	30,51
2	49,5	19,00
3	126,33	48,49
4	86	33,01
5	99	38,00
6	120	46,06
7	217,5	83,48
8	146	56,04

Tabela IX: Número total e densidade de células imuno-reativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no núcleo central da amígdala (CEA; n = 8) em animais que receberam o aparelho com força de distalização de 70 gramas por 3 horas.

<i>Número de células imuno-reativas a FOS</i>		
<i>Grupo 70 g 6 h</i>		
Animal	CEA	Densidade
1	97	37,23
2	123	47,2
3	113	43,37
4	178	68,32
5	118,5	45,48
6	118,5	45,48
7	114	43,75
8	134,5	51,62

Tabela X: Número total e densidade de células imuno-reativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no núcleo central da amígdala (CEA; n = 8) em animais que receberam o aparelho com força de distalização de 70 gramas por 6 horas.

<i>Número de células imuno-reativas a FOS</i>		
<i>Grupo 70 g 24 h</i>		
Animal	CEA	Densidade
1	31,33	12,02
2	27	10,36
3	25,33	9,72
4	68	26,10
5	53	20,34
6	60	23,03
7	56,5	21,69
8	74,5	28,59

Tabela XI: Número total e densidade de células imuno-reativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no núcleo central da amígdala (CEA; n = 8) em animais que receberam o aparelho com força de distalização de 70 gramas por 24 horas.

<i>Número de células imuno-reativas a FOS</i>		
<i>Grupo 48 h</i>		
Animal	CEA	Densidade
1	10	3,84
2	11	4,22
3	28,33	10,87
4	17,5	6,72
5	29,33	11,26
6	21	8,06
7	46,5	17,85

Tabela XII: Número total e densidade de células imuno-reativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no núcleo central da amígdala (CEA; n = 7) em animais que receberam o aparelho com força de distalização de 70 gramas por 48 horas.

<i>Número de células imunorreativas a FOS</i>		
<i>Grupo 70 g 3 h</i>		
Animal	HL	Densidade
1	92,5	21,44
2	69	15,99
3	113	26,19
4	85,33	19,78
5	99,5	23,06
6	17,33	4,02
7	111	25,73

Tabela XIII: Número total e densidade de células imunorreativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no hipotálamo lateral (HL; n = 7) em animais que receberam o aparelho com força de distalização de 70 gramas por 3 horas.

<i>Número de células imunorreativas a FOS</i>		
<i>Grupo 70 g 6 h</i>		
Animal	HL	Densidade
1	112	25,96
2	134	31,06
3	188	43,57
4	168	38,94
5	129	29,90
6	163,75	37,95
7	196	45,43
8	187	43,34

Tabela XIV: Número total e densidade de células imunorreativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no hipotálamo lateral (HL; n = 8) em animais que receberam o aparelho com força de distalização de 70 gramas por 6 horas.

<i>Número de células imunorreativas a FOS</i>		
<i>Grupo 70 g 24 h</i>		
Animal	HL	Densidade
1	98,66	22,87
2	129	29,90
3	86,5	20,05
4	66,33	15,37
5	145	33,61
6	78,33	18,15
7	80,5	18,66
8	34	7,88

Tabela XV: Número total e densidade de células imunorreativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no hipotálamo lateral (HL; n = 8) em animais que receberam o aparelho com força de distalização de 70 gramas por 24 horas.

<i>Número de células imuno-reativas a FOS</i>		
<i>Grupo 48 h</i>		
Animal	HL	Densidade
1	15,5	3,59
2	22,33	5,18
3	23,66	5,48
4	53	12,28
5	15,5	3,59
6	31,66	7,34
7	87	20,16

Tabela XVI: Número total e densidade de células imuno-reativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no hipotálamo lateral (HL; n = 7) em animais que receberam o aparelho com força de distalização de 70 gramas por 48 horas.

<i>Número de células imuno-reativas a FOS</i>		
<i>Grupo morfina 3 h</i>		
Animal	CEA	Densidade
1	7	2,69
2	0	0,00
3	5	1,92
4	0	0,00
5	0	0,00
6	0	0,00

Tabela XVII: Número total e densidade de células imuno-reativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no núcleo central da amígdala (CEA; n = 6) em animais que receberam aplicação de sulfato de morfina (2 mg/kg) 30 minutos antes da inserção do aparelho com força de 70g e foram perfundidos após 3 horas.

<i>Número de células imuno-reativas a FOS</i>		
<i>Grupo morfina 3 h</i>		
Animal	HL	Densidade
1	22	5,10
2	23	5,33
3	13	3,01
4	0	0,00
5	0	0,00
6	5	1,16

Tabela XVIII: Número total e densidade de células imuno-reativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no hipotálamo lateral (HL; n = 6) em animais que receberam aplicação de sulfato de morfina (2 mg/kg) 30 minutos antes da inserção do aparelho com força de 70g e foram perfundidos após 3 horas.

<i>Número de células imuno-reativas a FOS</i> <i>Grupo diclofenaco manipulado 6 h</i>		
Animal	CEA	Densidade
1	37	14,20
2	39	14,97
3	47,5	18,23
4	52	19,96
5	40	15,35

Tabela XIX: Número total e densidade de células imuno-reativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no núcleo central da amígdala (CEA; n = 5) em animais que receberam aplicação prévia de diclofenaco de sódio e foram apenas manipulados, sendo perfundidos após 6 horas.

<i>Número de células imuno-reativas a FOS</i> <i>Grupo diclofenaco manipulado 6 h</i>		
Animal	HL	Densidade
1	75	17,38
2	45	10,43
3	60	13,91
4	53	12,28
5	84,5	19,58

Tabela XX: Número total e densidade de células imuno-reativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no hipotálamo lateral (HL; n = 5) em animais que receberam aplicação prévia de diclofenaco de e foram apenas manipulados, sendo perfundidos após 6 horas.

<i>Número de células imuno-reativas a FOS</i> <i>Grupo diclofenaco 70 g 6 h</i>		
Animal	CEA	Densidade
1	50,8	19,50
2	33,89	13,01
3	55,3	21,22
4	60,8	23,34
5	106,2	40,76
6	95,5	36,65

Tabela XXI: Número total e densidade de células imuno-reativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no núcleo central da amígdala (CEA; n = 6) em animais que receberam aplicação de diclofenaco de sódio 30 minutos antes da inserção do aparelho com força de 70 g e foram perfundidos após 6 horas.

<i>Número de células imunorreativas a FOS</i> <i>Grupo diclofenaco 70 g 6 h</i>		
Animal	HL	Densidade
1	108,12	25,06
2	83,5	19,35
3	75	17,38
4	100,66	23,33
5	87,66	20,32
6	104,66	24,26

Tabela XXII: Número total e densidade de células imunorreativas a FOS (área de 0,1mm²) localizadas no hipotálamo lateral (HL; n = 6) em animais que receberam aplicação de diclofenaco de sódio 30 minutos antes da inserção do aparelho com força de 70g e foram perfundidos após 6 horas.