

Ana Luísa Novais Maló de Abreu

# Resposta do Periodonto Induzida pelo Movimento Dentário Ortodôntico

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina Dentária, especialidade de Odontopediatria e Ortodontia (Ortodontia), sob orientação do Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita e da Professora Doutora Maria Carmen Martins de Carvalho Alpoim apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Outubro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra  
para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde,  
ramo de Medicina Dentária, especialidade de Ortodontia.

A Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina  
e à forma desta tese (Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, Art. 108 & único).



**Orientadores**

Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita

Professora Doutora Maria Carmen Martins de Carvalho Alpoim



A elaboração deste trabalho decorreu em colaboração com:

I. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC):

- a) Instituto de Patologia Experimental (IPE)
- b) Instituto de Anatomia Patológica e Patologia Molecular (IAP-PM)

II. Universidade do Porto (UP):

- a) Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS-UP)
- b) Instituto de Patologia e Imunologia Molecular (IPATIMUP)



“Qu’est-ce qu’un homme révolté? Un homme qui dit non.  
Mais s’il refuse, il ne renonce pas: c’est aussi un homme qui  
dit oui, dès son premier mouvement.”

Albert Camus  
*L’homme révolté* (1951)



À minha família



## **AGRADECIMENTOS**

Ao longo dos anos em que este trabalho se foi desenvolvendo, foram vários os interlocutores que me acompanharam, cuidando de não me deixarem só, tanto no trabalho intelectual como nos afectos. Sinto, por tal, necessidade de distinguir aqueles que, de um ou outro modo, contribuíram mais significativamente para que pudesse atingir este objetivo e que me merecem particular reconhecimento.

Em primeiro lugar aos meus orientadores Senhor Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita e Senhora Professora Doutora Maria Carmen Martins de Carvalho Alpoim sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho, a quem agradeço por toda a disponibilidade e dedicação concedidas na orientação desta tese e, sobretudo, pela sábia crítica que permitiu a este trabalho atingir o objetivo desejado.

Ao Senhor Professor Doutor Francisco José Fernandes do Vale pela amizade e apoio, sem os quais a concretização desta tese teria sido impossível.

À Senhora Professora Doutora Fátima Gartner que pela sua disponibilidade, simpatia, cooperação e saber permitiu que a realização da parte final deste projeto fosse possível.

À Senhora Professora Doutora Lina Maria Rodrigues Carvalho pelo privilégio de ter partilhado comigo os seus conhecimentos, pela sua orientação atenta e constante ao longo da realização deste trabalho e cujos conhecimentos de anatomia patológica asseguraram a correta identificação das células presentes.

À Senhora Dr.<sup>a</sup> Ana Rafael que desde o mestrado me tem acompanhado nesta caminhada e cuja amizade, escuta ativa e crítica permitiu a abertura de caminhos na reflexão e aprofundamento das metas a que me propus.

Ao Senhor Dr. João Brochado Martins agradeço o apoio, a partilha e as valiosas contribuições sem as quais as avaliações histológicas ficariam incompletas.

À Senhora Professora Doutora Helena Figueiredo que sempre acreditou nas minhas capacidades e cujo vasto saber contribuiu para a correta análise dos meus resultados.

Aos Técnicos do Instituto de Patologia Experimental e do Instituto de Anatomia Patológica e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra queria expressar a minha sincera gratidão pela disponibilidade e apoio na preparação de todo o meu trabalho prático.

E por fim, àqueles que mais considero, a minha família.



# Índice

---

<b>Capítulo I. Introdução</b> .....	1
I. Inflamação.....	7
I.1. Células inflamatórias.....	9
I.1.1. PMNs.....	9
I.1.2. Sistema monocítico-macrofágico.....	10
I.1.3. Linfócitos.....	11
I.1.4. Plaquetas.....	13
I.2. Inflamação aguda.....	13
I.2.1. Eventos vasculares.....	14
I.2.2. Eventos celulares.....	17
I.2.3. Quimiotaxia.....	19
I.2.4. Mesênquima.....	20
I.2.5. Resolução da inflamação aguda.....	21
I.2.6. Morte celular e fagocitose.....	22
I.2.7. Inflamação crónica.....	24
2. Inflamação e biomarcadores no movimento dentário.....	26
3. Biomarcadores da inflamação.....	34
3.1. TGF- $\beta$ .....	34
3.2. TGF- $\beta$ e SMADs.....	35
3.3. TGF- $\beta$ , Smads e EMT.....	40
3.4. TGF- $\beta$ , Smads e embriogénese craniofacial.....	42
3.5. TGF- $\beta$ e cavidade oral.....	43
3.6. TGF- $\beta$ e inflamação.....	44
3.7. TGF- $\beta$ e clínica.....	46
4. Objetivos.....	49

<b>Capítulo II. Estudo Experimental em Modelo Animal</b> .....	51
1. Material e Métodos .....	53
1.1. Animais e Grupos Experimentais .....	53
1.2. Movimento dentário experimental.....	54
1.3. Estudo Necrósico Macroscópico .....	56
1.4. Estudo Micro-morfológico .....	57
2. Resultados .....	59
2.1. Observação macroscópica .....	59
2.2. Histopatologia .....	60
2.2.1 Grupo C01 – Controlo, sem manipulação .....	60
2.2.2 Grupo T01 – Fase ativa com manipulação, elastómero mantido durante 24 horas.....	70
2.2.3. Grupo T02 - Fase ativa com manipulação, elastómero mantido durante 48 horas .....	84
2.2.4. Grupo T03 - Fase ativa com manipulação, elastómero mantido durante 72 horas .....	94
2.2.5. Grupo T04 - Fase ativa com manipulação, elastómero mantido durante 96 horas .....	106
3. Discussão .....	119
4. Conclusões.....	143
5. Perspetivas futuras.....	145
<b>Capítulo III. Resumo</b> .....	147
<b>Capítulo IV. Abstract</b> .....	153
<b>Capítulo V. Bibliografia</b> .....	159
<b>Capítulo VI. Anexos</b> .....	189
Listagem de Acrónimos .....	191
Listagem de Figuras .....	195
Listagem de Tabelas.....	203

## **Capítulo I. Introdução**

---



É um facto bem conhecido que a aplicação de cargas mecânicas aos dentes com o objetivo de promover movimento dentário tem um papel crucial na regulação da fisiologia quer do osso alveolar quer do ligamento periodontal, uma vez que a força exercida induz respostas celulares que estão na base do movimento dentário ortodôntico. Deste modo, as estratégias clínicas utilizadas no tratamento ortodôntico deverão estar fundamentadas nas interações que ocorrem entre os sistemas de forças aplicados e os mecanismos biológicos que intervêm na resposta dos tecidos periodontais afetados.

A ênfase num tratamento ortodôntico centrado apenas na correção das alterações oclusais, como se os dentes e os maxilares existissem e funcionassem independentemente do resto do organismo, não será a aproximação mais correta ao problema. A investigação realizada sobre a biologia básica subjacente ao movimento ortodôntico tem demonstrado a importância dos processos biológicos que decorrem com uma grande variedade de respostas provenientes dos diferentes tipos de células presentes no periodonto. Tal facto implica que as abordagens terapêuticas e a escolha da mecanoterapia a utilizar no tratamento ortodôntico tenham em linha de conta não só o perfil bioquímico de cada paciente (Krishnan e Davidovitch, 2006), mas também o respetivo fenótipo, nomeadamente no que diz respeito à sua suscetibilidade à reabsorção óssea e à reabsorção radicular (Abass e Hartsfield, 2008).

Diferentes indivíduos com o mesmo tipo de má oclusão, sujeitos ao mesmo tipo de tratamento e com a mesma prescrição de *brackets* poderão apresentar diferentes graus de lesão iatrogénica dos tecidos periodontais, postulando-se que algo mais do que a aparatologia e a mecânica utilizadas tenha influência no resultado final do tratamento. A histologia demonstrou que a resposta às forças ortodônticas além de variar de indivíduo para indivíduo, depende de fatores como a idade, sexo, tipo e densidade do osso alveolar ou tipo de movimento criado (Reitan, 1954; Reitan, 1964; Bridges e col., 1988). Há que ter também em consideração o facto de que forças idênticas não se distribuem do mesmo modo ao longo do ligamento periodontal e do osso alveolar afetados; que a magnitude da aposição e reabsorção de tecido ósseo está dependente da intensidade, direção e da duração das forças atuantes (Meikle, 2006); e que a ação dessas forças sobre o ligamento periodontal é mais significativa para a remodelação óssea do que os efeitos de forças agindo diretamente sobre o osso alveolar (Tanne e col., 1992).

A prática ortodôntica prevê que o movimento dentário se dê através de alterações adaptativas, cujo principal objetivo é restabelecer o equilíbrio do meio periodontal, principalmente por remodelação dos vários tecidos constituintes. O princípio de que o movimento ortodôntico se dá devido à aposição e reabsorção de tecido ósseo ao nível do alvéolo é conhecido pelo menos desde 1839, quando C.A. Harris publicou o seu livro

“*The dental art, practical treatise on dental surgery*” (Meikle, 2006). As bases biológicas deste movimento, baseadas na remodelação e reparação do osso alveolar e do ligamento periodontal que ocorrem no lado de pressão e no lado de tensão, têm sido bem documentadas nos diferentes estudos sobre movimento dentário ortodôntico. Para tal foi paradigmática a contribuição de Carl E. Sandstedt que em 1901 foi o primeiro a demonstrar através de experimentação em modelo animal em cão, que além de haver formação de novo osso nas áreas de tensão e reabsorção de tecido ósseo nas áreas de pressão, havia também o desenvolvimento de zonas de hialinização durante o movimento (Persson, 2005).

Já Albin Oppenheim, a partir de 1911, com base em estudos experimentais efetuados em modelo animal em macaco, terá sido o primeiro a referir que não é a força exercida que desloca o dente, mas que o movimento ocorre pelo facto daquela força estimular a atividade celular e a atividade circulatória, enfatizando que o movimento seria mais eficaz quando realizado através do uso constante de forças leves (Noyes, 1945).

Atualmente, a investigação está principalmente voltada para a pesquisa dos mecanismos biológicos subjacentes às respostas que ocorrem ao nível genético, celular e molecular (Krishnan e Davidovitch, 2006). Elementos celulares dos sistemas nervoso, vascular e imune participam nas reações do periodonto, situação que se torna mais complexa, uma vez que a deslocação dos dentes ao longo do osso alveolar através da aplicação de forças tem na sua base um processo inflamatório. Tal facto implica que a compreensão plena do movimento dentário ortodôntico exija, além de conhecimentos sobre os mecanismos de mecanotransdução esquelética, que se compreendam os mecanismos inflamatórios mais importantes (Wise e King, 2008).

O movimento dentário gerado pela aplicação de forças ortodônticas é resultante de um processo inflamatório controlado, criado artificialmente pelo ortodontista, com o objetivo de obter resultados terapêuticos. Deste modo, a remodelação tecidual que acontece durante o movimento é facilitada em grande parte por reações inflamatórias que ocorrem nos tecidos periodontais sujeitos a forças de pressão no lado do movimento e a forças de tensão no lado oposto ao do movimento. Estas forças ortodônticas vão estimular o sistema nervoso e o sistema imunitário, sendo a inflamação produzida a resposta temporária de um sistema fechado que as entende como uma agressão. No entanto, nenhuma sequela deverá ser posteriormente detetada, se as forças aplicadas forem de fraca intensidade e desde que a inflamação não seja complicada por qualquer infeção local (Davidovitch e col., 1997).

As forças exercidas sobre os dentes são transmitidas ao ligamento periodontal, cujas células respondem regulando a reabsorção e aposição de tecido ósseo através de sinalização autócrina e parácrina às células alvo. Este ligamento, intermediário da transmissão das forças ao osso alveolar, que apresenta a dupla função de funcionar como sistema de suporte dos dentes, ao mesmo tempo que permite o seu movimento fisiológico ou ortodôntico, compartilha semelhanças morfológicas e funcionais com o periosteio (Horiuchi e col., 1999), com o qual se vai fundir ao nível da crista alveolar. Ele tem nomeadamente a capacidade de influenciar a formação de tecido mineralizado quer ao nível do osso alveolar quer do cimento radicular (Sisminadou e col., 1996).

Para que o movimento ortodôntico seja efetivo, basicamente três tipos de populações celulares do periodonto respondem não só a estas cargas mecânicas, mas também a um largo número de moléculas sinalizadoras como citocinas e fatores de crescimento que se encontram sobreexpressos tanto no lado de pressão como no lado de tensão (Davidovitch, 1995). No osso alveolar, os osteoblastos estão implicados no mecanismo de formação óssea e na sinalização do mecanismo de reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos; já no ligamento periodontal, as células mais comuns, os fibroblastos, têm papel importante na remodelação, reparação e desenvolvimento do ligamento, bem como uma função importante na síntese de citocinas pró-inflamatórias.

É importante, no entanto, referir que os fibroblastos ligamentares com origem em células das cristas neurais (CCNs) não são fenotipicamente idênticos. Existem duas importantes sub-populações: uma

correspondente a fibroblastos comuns que são principalmente produtores de matriz de tecido conjuntivo e outra correspondente a fibroblastos osteoblasto-like. Esta população de fibroblastos osteoblasto-like ricos em Fosfatase alcalina (ALP), além de ser considerada como uma linha celular precursora de osteoblastos e de cementoblastos, é a responsável pela produção das fibras de cimento acelular extrínseco (Cho e Garant, 2000; Garant, 2003b; Ten Cate, 2003).

O ligamento periodontal, em desenvolvimento ou maduro, contém também células mesenquimatosas indiferenciadas localizadas nos espaços perivasculares (McCulloch e Melcher, 1983; McCulloch, 1985) com potencial para se diferenciarem em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos (Roberts e Chase, 1981; McCulloch e Melcher, 1983). Deste modo, tanto as células mesenquimatosas indiferenciadas como os fibroblastos do ligamento são células fundamentais à remodelação, regeneração e reparação quer do tecido laxo quer dos tecidos mineralizados do periodonto.

As respostas tecidulares e celulares iniciam-se na fase inicial do movimento ortodôntico, na qual a inflamação é aguda e predominantemente exsudativa, havendo vasodilatação dos vasos periodontais e migração dos leucócitos para o ligamento periodontal. Aqui, estes são localmente responsáveis pela síntese de variadas citocinas sinalizadoras que estimulam a síntese e secretação de mediadores como prostaglandinas (PGs), fatores de crescimento, assim como de mais citocinas. Um a dois dias após a aplicação da força, a inflamação aguda converte-se numa inflamação crónica predominantemente proliferativa no que diz respeito aos fibroblastos, células endoteliais, osteoblastos e às células dos espaços medulares que se mantém até à reativação do aparelho fixo durante a consulta de controlo seguinte com o ortodontista, da qual resultará uma nova fase de inflamação aguda que se irá sobrepor há já existente inflamação crónica (Krishnan e Davidovitch, 2006).

Dentro deste cenário, tornou-se importante a determinação do papel que estas diferentes moléculas, como os fatores de crescimento, têm nos processos bioquímicos do movimento dentário. Efetivamente, estudos efetuados até à data têm-se vindo a debruçar sobre diferentes aspetos dos mecanismos moleculares da resposta inflamatória do ligamento periodontal. A participação deste tecido é efetuada através da síntese e secretação de mediadores que alteram a proliferação, a diferenciação e as funções secretoras das suas células constituintes. Neste processo tem-se observado um aumento da síntese do Fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ , *Transforming growth factor*- $\beta$ ); de mediadores pró-inflamatórios como a Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), do Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , *Tumor necrosis factor*- $\alpha$ ) e da Prostaglandina E2 (PGE2); de Colagénio tipo I e diminuição da ALP (Brady e col., 1998).

Como as forças aplicadas levam à distorção da matriz extracelular do ligamento, o fluido periodontal extravasa, pelo que também é possível detetar a presença de IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ , Fator de crescimento epidermal (EGF, *Epidermal growth factor*), Microglobulinas- $\beta$ 2 e TNF- $\alpha$  no fluido crevicular do sulco gengival dos dentes sujeitos a estas forças (Lowney e col., 1995; Uematsu e col., 1996a; Uematsu e col., 1996b).

Atualmente, os processos inflamatórios subjacentes a um vasto número de doenças têm sido objeto de estudo dada a crescente descoberta de patologias associadas a marcadores moleculares da inflamação. Muitos aspetos das cascatas inflamatórias que decorrem nestas situações ainda estão sob análise, sendo crucial a identificação dos participantes teciduais, celulares e bioquímicos, tendo em vista particularmente a implementação de novas estratégias terapêuticas (Schmid-Schönbein, 2006).

Apesar da cascata inflamatória ser reconhecidamente um mecanismo de reparação tecidual, a deteção precoce da presença de sinais associados à inflamação não deixa de ser um indício importante que um tecido ou órgão está envolvido num processo de reparação que poderá ou não ter a sua resolução. A monitorização íntima e constante deste mecanismo é mandatória, designadamente durante o tratamento ortodôntico, de modo a que não haja a desregulação de todo o processo que possa levar a perdas irreparáveis nos tecidos periodontais.

Existem várias abordagens ao estudo da inflamação em tecidos vivos, com recurso a modelos experimentais agudos ou crónicos, mas em humanos o seu estudo é ainda bastante limitado, a menos que os processos inflamatórios a decorrer sejam superficiais e acessíveis por técnicas microscópicas (Schmid-Schönbein, 2006).

No humano, o estudo dos mecanismos celulares dos processos inflamatórios que ocorrem no periodonto ainda é limitado, muito embora seja um modelo testado e validado nos estudos sobre a homeostase de tecidos conjuntivos, dado que contém populações celulares que sintetizam, reparam e remodelam tecidos conjuntivos laxos e mineralizados. O recurso a modelos de experimentação animal permite, no entanto, colmatar esta contingência, principalmente nos estudos sobre movimento dentário ortodôntico.

## I. Inflamação

Os organismos multicelulares vertebrados respondem à agressão dos seus tecidos através de uma série de eventos cujo objetivo final é a eliminação do agente causal, a contenção da lesão e a remoção e reparação do tecido lesado e danificado (Bartold e Narayanan, 1998). Nestes casos, a resposta inflamatória produzida é pré-programada e estereotipada, sendo o único mecanismo conhecido de reparação tecidular após uma lesão (Schmid-Schönbein, 2006).

O sistema imune destes organismos multicelulares é muito complexo e envolve respostas inatas ou naturais não específicas e respostas específicas adquiridas ou adaptativas, estando a diferença essencial entre os dois mecanismos no modo pelo qual o agente agressor é identificado (Martínez-Borra e col., 2012).

Excetuando as barreiras mecânicas e químicas, a resposta inata é primeira linha de defesa de um hospedeiro contra um agente infeccioso ou contra um trauma ou agressão, tendo um papel importante no reconhecimento precoce destes e no subsequente despoletar do processo inflamatório (Medzhitov e Janeway, 2000).

Esta resposta imune inata apresenta um grau médio de especificidade uma vez que consegue fazer a distinção entre o *self* e o *non-self* (Mogense, 2009; Danilova, 2012). Na presença de agentes infecciosos, as células do sistema inato residentes nos tecidos como macrófagos, fibroblastos, mastócitos e células dendríticas; bem como leucócitos circulantes, nos quais se incluem os neutrófilos e monócitos (Newton e Dixit, 2012); reconhecem padrões moleculares específicos comuns a um largo número de agentes patogénicos (Martínez-Borra e col., 2012), geralmente designados por Padrões moleculares patogénico-associados (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*). Estes padrões são característicos de organismos infecciosos, faltando-lhes a especificidade estrutural que lhes permite serem reconhecidos (Danese e col., 2007; Libby, 2007), pelo que são identificados como *non-self* por recetores reconhedores de padrões (PRRs, *pattern recognition receptors*) presentes na superfície dos granulócitos, macrófagos, células dendríticas, células exterminadoras naturais (NK, *natural killers*) e células T NK (NKT), assim como pelo sistema do complemento (Vivier e col., 2008; Mogensen, 2009).

Na cavidade oral em particular, o Lipopolissacarídeo (LPS) e as enzimas proteolíticas das bactérias gram-negativas, os ácidos teicóicos das bactérias gram-positivas (Walter, 2007) e outros antígenos bacterianos desencadeiam respostas no hospedeiro que incluem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, o aumento da proliferação e da migração de células inflamatórias e a secreção e ativação das metaloproteínases da matriz extracelular (Tjäderhane e col., 2007).

A penetração do epitélio juncional por estas moléculas gera uma resposta inflamatória local e apesar de muitos produtos inflamatórios finais terem uma atividade protetora contra as bactérias e os seus metabolitos, muito deles têm, no entanto, a capacidade de agravar a lesão do tecido hospedeiro (Oshiro e col., 2012).

A membrana citoplasmática de células como os neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células endoteliais tem uma grande variedade de recetores de reconhecimento de PAMPs como os recetores *Toll-like* (TLRs) (Walter, 2007; Lodish e col., 2013; Danese e col., 2007) ou como os recetores *scavenger* expressos nos macrófagos (Janeway e Medzhitov, 2002) que monitorizam o ambiente circundante com o objetivo de detetar estas moléculas (Medzhitov e Janeway, 2000).

A sinalização dos TLRs é afetada por pequenas diferenças estruturais que existem nos produtos bacterianos e a combinação entre diferentes TLRs diversifica e amplifica o reconhecimento de um grande número de ligandos (Wong, 2001).

Em situações que decorrem do trauma, isquémia, morte celular ou outro tipo de lesão celular, determinadas moléculas endógenas que usualmente executam funções não imunológicas são libertadas ou secretadas, iniciando uma resposta imune asséptica (Newton e Dixit, 2012; Krysko e col., 2013). Estas moléculas imunoestimuladoras são chamadas de Padrões moleculares lesão-associados (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*) e podem ter origem em qualquer compartimento das células afetadas (Garg e col., 2010; Krysko e col., 2011).

A maior parte dos DAMPs que se assemelham aos PAMPs estimulam o sistema imune através dos mesmos recetores (Kono e Rock, 2008) pertencentes a uma grande família de recetores citoplasmáticos reconhecedores de padrões onde se incluem os TLRs, os recetores *NOD-like* (NLRs, *NOD-like receptors*), os recetores *RIG-I-like* (RLRs, *RIG-like receptors*) e os recetores purinérgicos (Krysko e col., 2011).

A resposta imune não específica decorre com uma cascata complexa de fenómenos biológicos, na qual vários mecanismos celulares e humorais participam no controlo e coordenação das respostas defensivas produzidas. Estas respostas são reguladas por uma grande variedade de mensageiros químicos, muitos deles expressos quer por células circulatórias que são recrutadas para a área afetada, quer por células residentes tais como células epiteliais, fibroblastos e células endoteliais (Garant, 2003a).

A resposta imune inata destes organismos multicelulares, além de reter o mecanismo primário da fagocitose, requer também a participação ativa do sistema vascular e de células especializadas contidas nos tecidos afetados. Nestas circunstâncias, a inflamação poderá ser definida como uma resposta vascular à agressão (Majno, 1998), dado que é um processo caracterizado basicamente pelo movimento de fluido e leucócitos desde da corrente sanguínea até ao local lesado. Convém mencionar também que, dependendo da intensidade da lesão e da magnitude da resposta inflamatória, poderá ocorrer envolvimento sistémico.

Não existe uma compartimentação bem definida entre a inflamação não específica e a reação imunitária específica, fazendo ambas parte do mesmo mecanismo e ocorrendo concomitantemente. A resposta imune adaptativa evoluiu a partir dos mecanismos da resposta inata e não pode funcionar sem esta (Danilova, 2012). O sistema inato além de ser essencial ao reconhecimento precoce de um patógeno, alertando o sistema adaptativo, está também envolvido na ativação e formatação da imunidade adaptativa. No fundo, o sistema inato interpreta o contexto biológico do agente antagonista e informa e instrui o sistema adaptativo a produzir a resposta apropriada, exercendo o controlo deste através do fornecimento de sinais coestimuladores, antigénios e citocinas (Wong, 2001).

Fatores quimiotáticos como o Fragmento C5a que apresenta funções biológicas amplas, induzido pela via do complemento e por citocinas pró-inflamatórias expressas por células pertencentes ao sistema inato, são potentes estimuladores de uma resposta inflamatória que abre caminho à ativação do sistema adaptativo (Wang e col., 2010). De igual modo, os recetores opsónicos ou os PRRs presentes nos macrófagos sinalizam e induzem estes fatores quimiotáticos a estimular as células T (Flajnik e Du Pasquier, 2004).

O sistema adaptativo é responsável pela eliminação de patógenos na fase tardia de uma infecção, sendo também responsável pela criação da memória imunitária, facto que permite ao organismo hospedeiro responder mais rapidamente ao agente ofensivo num futuro contacto. A resposta adaptativa caracteriza-se, tal como referido anteriormente, por uma especificidade desenvolvida a partir de combinações genéticas clonais de um amplo número de recetores antigénio-específicos presentes nos linfócitos (Mogensen, 2009).

A inflamação pode ser aguda ou crónica dependendo da duração da agressão, da natureza da resposta inflamatória e dos sintomas clínicos. A inflamação aguda tem uma curta duração e é caracterizada pela acumulação de fluido e de componentes do plasma no tecido afetado, pela estimulação vascular de plaquetas e pela infiltração do tecido lesado por células inflamatórias, as quais na fase inicial são predominantemente neutrófilos. Quando uma infecção se torna incontrolável ou há persistência do estímulo nocivo, o processo inflamatório desregula-se e surge a inflamação crónica (Kannaiyan e col., 2012). Uma cascata inflamatória que não alcance a resolução leva à disfunção do órgão ou tecido afetado e eventualmente à morte (Hüttemann e col., 2012).

A inflamação crónica tem uma maior duração e envolve principalmente o sistema celular monocítico-macrofágico, linfócitos e plasmócitos e está usualmente associada à proliferação de vasos sanguíneos e de tecido conjuntivo (Bartold e Narayanan, 1998).

## **1.1. Células inflamatórias**

As células participantes na inflamação incluem os polimorfonucleares (PMN), os monócitos/macrófagos, os linfócitos e as plaquetas. Os granulócitos e os monócitos migram da corrente sanguínea em resposta a alterações moleculares da superfície dos vasos sanguíneos que assinalam uma agressão ou infecção, não podendo contudo, ao contrário dos linfócitos, recircular os tecidos e os vasos (Vaday e Lider, 2000). É a natureza do estímulo inflamatório que determina qual o tipo celular predominante e conseqüentemente a especificidade dos sinais moleculares que controlam os variados tipos celulares atuantes (Springer, 1994).

Os neutrófilos são a população de células inflamatórias predominante nas primeiras 24 a 48 horas da resposta inflamatória, mas posteriormente, esta vaga inicial de neutrófilos é seguida por uma segunda vaga de monócitos (Casey, 2011), células que são muito menos frequentes na circulação. Uma vez chegados aos tecidos, os monócitos vão diferenciar-se em macrófagos tecidulares e/ou migram para os locais onde está a ocorrer a inflamação (Schmid-Schönbein, 2006).

Deste modo, uma importante linha de defesa de um tecido é a rápida mobilização de células fagocitárias, cujo principal função é a ingestão e destruição do organismo agressor, mecanismo no qual os neutrófilos são as células primordiais. Estes são células suicidas programadas para localizar e se direcionarem ao organismo invasor (quimiotaxia), capturá-lo (adesão), ingeri-lo por fagocitose e proceder à sua destruição expondo-o a espécies de oxigénio reativo (ROS, *reactive oxygen species*), a enzimas proteolíticas e a proteínas catiónicas (Garant, 2003c; Casey, 2011).

### **1.1.1. PMNs**

Os granulócitos PMN são uma família constituída por neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos, cada qual com a sua função. Se os neutrófilos são as células fagocitárias por excelência, expressando citocinas que modelam diversos aspectos do processo inflamatório como a atração de mais células inflamatórias, já

os eosinófilos estão associados às reações alérgicas e às infecções helmínticas (Ponte e col., 2007; Cruvinel e col., 2010). Os basófilos, que existem em muito pouca quantidade, têm um papel importante na iniciação da resposta imune tipo Th-2, tal como acontece nas reações inflamatórias alérgicas, ao expressarem IL-4 e ao funcionarem como células apresentadoras de antígenos, contribuindo também para a imunidade protetora contra patógenos como parasitas (Gibbs, 2008; Karasuyama e col., 2011).

Os neutrófilos são as células migratórias mais frequentes nas lesões inflamatórias e os maiores efetores da lesão do tecido afetado, o que ocorre através da libertação das suas proteases neurais e ácidas e devido à sua capacidade de gerar derivados de oxigénio reativo (Baggiolini, 1995).

Os neutrófilos circulantes estão quiescentes e têm de ser ativamente recrutados para o local da inflamação, o que acontece através da mediação de agentes quimioatratantes como o Fragmento do complemento C5a, o peptídeo bacteriano N-Formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), a IL-8 ou as quimiocinas CXC (Baggiolini, 1995).

Os leucócitos PMN, tal como todas as outras células efectoras da inflamação, desenvolvem-se a partir de células estaminais pluripotentes da medula óssea estimuladas pelo Fator de estimulação de colónia de granulócitos-monócitos (GM-CSF, *Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*) (Liu e col., 1991; van Eeden e col., 2000), que além de estimular os neutrófilos estimula também monócitos, macrófagos e eosinófilos; e pelo Fator de estimulação de colónia de granulócitos (G-CSF, *Granulocyte colony-stimulating factor*). O GM-CSF induz também o aumento dos efeitos pró-inflamatórios nomeadamente através do aumento quer da ativação quer da resposta das integrinas  $\beta$  ao TNF- $\alpha$  e pelo aumento da expressão de IL-1 $\beta$  na linha celular monocítica-macrofágica (Rosenbloom e col., 2005).

Uma vez que os neutrófilos são células de vida curta, há necessidade de uma produção constante a partir de células tronco hematopoiéticas e células progenitoras da médula óssea, de modo a garantir um reservatório que assegure a proteção contra patógenos invasores. Se uma infeção não for contida e há o desenvolvimento de uma situação potencialmente letal, os neutrófilos são ativados em larga escala e o sistema hematopoiético tem que se adaptar, passando a um estágio de granulopoiese de emergência. Este estágio é acompanhado de uma intensa produção de neutrófilos de *novo*, o que estimula a proliferação ao nível da medula óssea de células mielóides precursoras (Manz e Boettcher, 2014).

A marca distintiva dos PMNs são os seus três tipos de grânulos lisosomais especializados que se formam a partir do aparelho de Golgi. O primeiro tipo a formar-se contém Elastase, hidrolases ácidas, Lactoferrina, Lisozima, Glicoronidase  $\beta$ , defensinas e Mieloperoxidase. O segundo tipo a formar-se, os grânulos secundários, contém Lactoferrina, Citocromo C, Colagenase 2 (MMP8); MMP9 e Mac-1 (CD11b/CD18,  $\alpha$ M $\beta$ 2, Recetor do complemento 3, *Macrophage-1 antigen, Membrane-activated complex-1*). Os últimos a formarem-se, os grânulos terciários, contém MMP9, Trifosfato de adenosina, Citocromo C e Mac-1. Além disso, pequenas vesículas secretoras contêm ainda ALP e elementos do sistema Citocromo C oxidase (Garant, 2003c; Zarbock e Ley, 2008).

### **1.1.2. Sistema monocítico-macrofágico**

Tal como já foi referido, os monócitos são o segundo tipo celular participante na resposta inflamatória, chegando ao local geralmente sete horas depois da lesão inicial. A sua presença no local da inflamação poderá prolongar-se caso esta evolua para uma inflamação crónica, fase em que os neutrófilos já não se encontrarão presentes (Casey, 2011).

Os macrófagos encontram-se distribuídos pelos tecidos corporais onde são responsáveis pela ingestão e processamento de corpos estranhos, células mortas e outros tipos de resíduos, sendo também responsáveis pelo recrutamento adicional de mais macrófagos quando está acionada a cascata da inflamação (Murray e Wynn, 2011).

As células do sistema monocítico-macrofágico são multipotentes no que diz respeito à sua diferenciação e são, como tal, precursores de osteoclastos, cementoclastos, macrófagos ou células dendríticas (Atanga e col., 2011). Deste modo, eles constituem um grupo de células muito heterogêneo que consegue rapidamente alterar a sua função e a sua diferenciação terminal em resposta a sinais do micro-ambiente, sendo essa diferenciação regulada por um conjunto de fatores de crescimento e citocinas (Atanga e col., 2011; Murray e Wynn, 2011).

Os monócitos, quer na fase final da inflamação aguda quer na inflamação crônica, uma vez chegados ao local da inflamação, diferenciam-se em macrófagos que atuam funcionalmente como: (1) células dendríticas mielóides ou macrófagos classicamente ativados; (2) macrófagos anti-inflamatórios e pró-resolução alternativamente ativados que asseguram a depuração de neutrófilos em apoptose e de resíduos celulares, participando na resolução da inflamação e consequente regeneração e reparação tecidual e (3) macrófagos reguladores que suprimem as respostas imunes através da produção de altos níveis de IL-10 (Garant, 2003c; Kimura et al., 2010; Murray & Wynn, 2011). Com efeito, os macrófagos têm a capacidade única de produzir dois tipos de respostas com polaridades opostas de acordo com o metabolismo da L-arginina: (1) o subtipo reparação/cura (M2) quando aquela é metabolizada em NO supressor do crescimento ou (2) o subtipo morte/inibição (M1) quando o produto da metabolização é a L-ornitina promotora de crescimento (Mills, 2012; Mills e col., 2015). Os macrófagos com a função M2/cura mantêm a homeostase participando na reparação e substituindo células perdidas ou lesadas, mas têm a habilidade de converterem rapidamente no tipo com função M1/inibição. Ambos os subtipos são eficazes e potencialmente perigosos: (1) a sobreexpressão do subtipo M2 contribui para a manutenção de infecções crônicas, fibrose, alergia e processos tumorais (Mills, 2012); (2) enquanto a sobreexpressão do subtipo M1 tem um papel importante na aterosclerose, auto-imunidade e outras patologias que decorrem com inflamação crônica (Mills e col., 2015).

Os monócitos/macrófagos são células fagocitárias, responsáveis também pela expressão de cerca de cem mediadores inflamatórios, sendo capazes de sintetizar *de novo*, secretando-os no local da agressão. Eles sintetizam proteínas do sistema do complemento, bem como uma grande variedade de citocinas reguladoras e enzimas proteolíticas, importantes não só durante a resposta inflamatória, mas também durante o processo de reparação e remodelação dos tecidos (Garant, 2003c).

Os monócitos expressam a Glicoproteína ligando-1 da Selectina-P (PSGL-1, CD162, *P-selectin glycoprotein ligand-1*) que conjuntamente com as selectinas neles expressas, particularmente a Selectina-L (CD62L), medeiam o seu rolamento (Ley, 2003). Eles recorrem também às integrinas  $\beta 1$  e  $\beta 2$ , particularmente à Integrina  $\alpha 4\beta 1$  que tem como ligando a Molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1, *Vascular cell adhesion molecule*), para abandonar o sistema vascular e transmigrar para o compartimento extravascular.

As células do sistema monocítico-macrofágico apresentam na sua superfície um largo espectro de recetores como recetores *scavenger* que têm um número de ligandos muito diverso nos quais se incluem estruturas microbianas, moléculas endógenas DAMPs, polirribonucleotídeos, polissacarídeos ou produtos da degradação dos tecidos como lipoproteínas oxidadas de baixa densidade (Plüddemann e col., 2007). Deste modo, torna-se possível aos recetores mediar mecanismos como a fagocitose de bactérias opsonizadas, ativação de vias de sinalização que regulam a quimiotaxia, produção de citocinas pelos macrófagos e monócitos, depuração de células apoptóticas ou reconhecimento de antagonistas microbianos, entre outros (Garant, 2003c; Taylor e col., 2005).

### 1.1.3. Linfócitos

Os linfócitos apesar de serem células atuantes principalmente na imunidade adaptativa, são também algumas das células que se acumulam em locais de inflamação crônica. Existem principalmente duas populações

de linfócitos: (1) os células T ou linfócitos derivados do timo e (2) células B ou linfócitos derivados da medula óssea. Mas nem as células B nem as T constituem uma população homogênea. Ambos os grupos são compostos por várias sub-populações identificadas pela região conservada dos seus recetores, por associações específicas dos marcadores de superfície, pela sua localização nos órgãos linfóides e pela sua função variada. Na prática, a ligação de diferentes combinações de anticorpos monoclonais aos recetores antigénio-específicos, resultantes de diferentes combinações genéticas, que estão presentes na superfície destas células, é o método utilizado para identificar os diferentes sub-grupos celulares expressos (Mogensen, 2009). A família de células B apresenta uma grande variedade de genes que combinados permitem identificar um número quase infinito de antigénios, enquanto as células T apresentam uma capacidade mais reduzida na identificação de antigénios (Libby, 2007).

Quando em circulação, os linfócitos são células inocentes/*naives* que utilizam como via de migração através dos vasos linfáticos a passagem pelo endotélio especializado composto por células das vénulas endoteliais altas (HEVs, *high endothelial venules*) nos nódulos linfáticos periféricos ou nas placas de Peyer, sendo frequentemente detetados no baço (Schmid-Schönbein, 2006). Nos nódulos linfáticos, os linfócitos antigénio-específicos são ativados e migram até ao local da inflamação recorrendo a moléculas de adesão constitutivamente expressas nas células das HEVs como a Molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1/CD54, *Intercellular adhesion molecule-1*) (Cook-Mills e Deem, 2005).

A resolução da inflamação aguda traduz-se também na expansão clonal dos linfócitos, no aumento da síntese de anticorpos alergeno-específicos ou patógeno-específicos e na síntese de células B e T do plasma e de memória. Isto implica que, quando o hospedeiro tornar a entrar em contacto com o mesmo patógeno ou for exposto ao mesmo estímulo antagonista, o sistema imune estará preparado para responder com uma resposta imunitária rápida e apropriada (Khatami, 2014).

De entre os linfócitos, as células B produzem anticorpos, enquanto que as células T participam na resposta do hospedeiro mediada celularmente (Libby, 2007). Os linfócitos T invadem os tecidos mesmo que não existam sinais óbvios de inflamação, recorrendo às selectinas para adesão inicial ao endotélio (Schmid-Schönbein, 2006). Deste modo, também os linfócitos sofrem rolamento através da sua ligação às selectinas, evento que é seguido pela adesão firme efetuada pelas integrinas e mediada pelos recetores Gi-acoplados (Cinamon e col., 2001). Após a adesão firme, as células T transmigram através do endotélio e adquirem motilidade no tecido linfóide (Okada e col., 2002).

As células B e T em circulação expressam um grande número de recetores para quimiocinas, sendo o CCR7 e o CXCR4 os principais recetores que fornecem os sinais que induzem a entrada das células B nos nódulos linfáticos. Estes recetores conjuntamente com o recetor CXCR5 fornecem os sinais essenciais à entrada das células B nas placas de Peyer. O CCR7 e os seus ligandos CCL19 e CCL21 são responsáveis pela quimiotaxia dos linfócitos T. A presença de um grande número de ligandos destes recetores quer no lado abluminal quer luminal das HEVs sugere que eles sejam responsáveis pelo despoletar da adesão firme das células em rolamento, bem como da sua subsequente diapedese (Okada e col., 2002).

O Fator ativador de linfócitos B (BAFF/BlyS, *B-cell activating factor, B-lymphocyte stimulator*) é um potente fator de sobrevivência celular, pertencente à família do TNF- $\alpha$ , expresso em muitas células com origem hematopoiética (Fragioudaki e col., 2012). Ele tem um papel primordial na homeostase, tolerância e transformação maligna das células B. Ele regula a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células B através da sua ligação a três recetores do TNF- $\alpha$ : (1) o Ativador transmembranar modelador de cálcio e interator de ligando da ciclofilina (TACI, *Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor*); (2) o Antigénio da maturação das células B (BCMA, *B-cell maturation antigen*); (3) e o Recetor para o BAFF/BR3 (BAFF-R, *BAFF receptor, BlyS receptor 3*) que é específico para o BAFF (Shen e col., 2011).

A família do fator de transcrição Fator nuclear kapa B (NF- $\kappa$ B, *Nuclear factor kappa B*) regula o desenvolvimento, manutenção e estimulação das células B. A ligação do par BAFF/BAFF-R induz a sobrevivência celular destas células através da ativação da via do NF- $\kappa$ B1 e da via do NF- $\kappa$ B2 (Shen e col., 2011).

#### 1.1.4. Plaquetas

As plaquetas são fragmentos celulares não nucleados derivados dos megacariócitos da medula óssea e formadas por grânulos de substâncias vasoativas. Durante a resposta inflamatória elas são ativadas por complexos antigénio-anticorpo, corpos estranhos, endotoxinas bacterianas, mediadores químicos e outras moléculas; o que induz o seu deslocamento para o local da agressão, onde vão aderir e libertar o seu conteúdo por desgranulação.

As plaquetas têm na sua membrana moléculas de adesão similares às dos leucócitos, mas também têm moléculas únicas, algumas das quais se encontram armazenadas em grânulos citoplasmáticos, sendo libertadas quando as células são estimuladas. Designadamente, a Selectina-P (CD62P) encontra-se presente na superfície quer dos grânulos granulofisina-positivos (grânulos lisosomais) quer dos grânulos  $\alpha$  (Israels e col., 1992).

Os grânulos  $\alpha$  são os mais abundantes grânulos secretórios das plaquetas e são uma fonte de amino-ácidos vasoativos, fatores de crescimento e outras moléculas. Eles libertam um largo número de proteínas adesivas como o Fator de von Willebrand (vWF, *von Willebrand factor*), a Trombospondina e a Fibronectina; fatores mitogénicos como o Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, *Platelet-derived growth factor*), o TGF- $\beta$  e o Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, *Vascular endothelial growth factor*); fatores de coagulação como os fatores V, VII, XI, XIII e múltiplas quimiocinas (Zarbock e col., 2007).

As plaquetas ativadas expressam Selectina-P que ao interagir com os seus ligandos PSGL-1 e Glicoproteína (GP) I $\beta$  (Romo e col., 1999) permite o rolamento daquelas na parede endotelial recoberta pelo vWF libertado pelos corpos de Weibel-Palade das células endoteliais ativadas (Kragh e col., 2014).

Após a adesão das plaquetas ao endotélio, elas formam uma plataforma sobre a qual os leucócitos rolam (Zarbock e col., 2007). Os leucócitos são também recrutados para os trombos que vão ajudar a organizar e resolver (Ley, 2003). A Selectina-P recruta também micropartículas derivadas dos monócitos que são uma fonte importante Tromboplastina (Fator de tecido) para o trombo em formação (André e col., 2000).

As plaquetas também utilizam o complexo GP I $\beta$ -IX-V para se ligarem às proteínas subendoteliais da matriz extracelular. A ligação ao Colagénio é facilitada pelos Recetores  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 e GPVI (glicoproteína de membrana VI), enquanto que a Integrina  $\alpha$ 2 $\beta$ 3 (GPIIb/IIIa), o mais abundante recetor nas plaquetas, estabelece a adesão firme das plaquetas ao Colagénio, Fibronectina e Laminina da matriz extracelular, bem como aos leucócitos (Zarbock e col., 2007).

## 1.2. Inflamação aguda

A inflamação aguda é normalmente uma resposta protetiva localizada a um trauma ou a uma infeção, na qual a interação entre os fenómenos inflamatórios e os fenómenos imunes poderá ser menos manifesta. Esta interação torna-se, no entanto, mais evidente na inflamação crónica, na qual o agente causal persiste durante um largo período de tempo.

A inflamação aguda pode durar minutos ou dias e é caracterizada pelos sinais cardinais descritos por Celsus (c25 AEC – c50 EC): rubor, calor, tumor e dor (Winyard, 2003; Schmid-Schönbein, 2006), primariamente associados às alterações vasculares que ocorrem devido à libertação de mediadores químicos. O quinto sinal

*functio laesa*, identificado por Galeno (c129 AEC – c217 AEC) e posteriormente recuperado por Virchow (1821 EC – 1902 EC) em 1858 no seu livro *Cellularpathologie* (Majno, 1975), que diz respeito à disfunção dos tecidos e órgãos atingidos, é provavelmente resultante da resposta neurológica à dor.

A presença de produtos de origem bacteriana, proteínas do choque térmico (HSPs, *heat shock proteins*) e proteínas do Complexo principal de histocompatibilidade classe I-like (MHC, *Major histocompatibility complex*) ou a ausência de moléculas da superfície celular MHC classe I representam sinais de infecção ou de stress celular (Wong, 2001), alertando para o desenvolvimento de uma reação inflamatória.

Nos casos de lesões assépticas que decorram sem a presença de patógenos, a inflamação aguda tem como objetivo a reparação tecidual ao mesmo tempo que atua prevenindo a colonização dos tecidos lesados por patógenos oportunistas. Sabe-se que moléculas libertadas por células em processo de morte, produtos da degradação da matriz extracelular e produtos da cascata proteolítica ativada pela lesão vascular estão envolvidos no processo. Todos eles são detetados quer por macrófagos residentes nos tecidos que vão induzir uma resposta inflamatória com o objetivo final de reparação, quer por nociceptores que despoletam a sensação de dor na área afetada (Medzhitov, 2010).

Mas invariavelmente qualquer processo agudo é despoletado por mastócitos e macrófagos teciduais, cuja desgranulação e ativação levam à libertação de um grande número de mediadores pró-inflamatórios, nos quais se incluem aminas bioativas como a histamina e a 5-hidroxitriptamina (5-HT), citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos que coletivamente ativam e recrutam as células inflamatórias (Lawrence e Gilroy, 2006).

A resposta aguda caracteriza-se pelo rápido influxo de granulócitos, primariamente neutrófilos (Ohashi e col., 1996), seguido pela acelerada afluência de monócitos que maturam em macrófagos inflamatórios, que subsequentemente proliferam e vão afetar a função e fenótipo dos macrófagos residentes no tecido danificado (Majno, 1975; Ricciotti e FitzGerald, 2011).

A cascata da inflamação aguda apresenta como componentes principais: (1) alterações no calibre vascular que se traduzem num aumento do fluxo sanguíneo (hiperémia); (2) alterações estruturais da microvasculatura que induzem um aumento da permeabilidade e permitem que fluido, proteínas do plasma e leucócitos saiam da microcirculação; (3) a chegada das células inflamatórias à zona afetada; (4) a diluição dos agentes agressores presentes na área; (5) desagregação do tecido lesado através de atividade enzimática e formação de radicais livres de oxigénio; (6) isolamento desta área do tecido saudável e da circulação sistémica; (7) necrose e apoptose; (8) remoção de detritos e células por fagocitose (9) e o proporcionar do micro-ambiente necessário ao processo de regeneração/reparação (Schmid-Schönbein, 2006; Granger e Senchenkova, 2010).

Nos casos que decorrem com a presença de agentes nocivos, uma vez este eliminado por meio de fagocitose, a reação inflamatória pode diminuir e resolver-se. Nessa altura, também os granulócitos são eliminados e os macrófagos e linfócitos retomam quer o seu fenótipo quer a sua quantidade pré-inflamatória. A finalização normal de um processo inflamatório é, deste modo, a sua resolução acompanhada pela reparação do tecido lesado e não a sua persistência que pode, em último caso, traduzir-se em perda de função (Ricciotti e FitzGerald, 2011).

### **1.2.1. Eventos vasculares**

A microvasculatura pode ser dividida em três segmentos com diferentes estruturas e com distintas funções fisiológicas: (1) arteríolas que regulam o fluxo sanguíneo e que se ramificam em vasos de menor diâmetro, nos quais o número de camadas musculares diminui progressivamente até que células endoteliais individuais atapetem a membrana basal formando (2) os capilares, seguidos pelas vénulas pós-capilares (3) e

posteriormente pelas vénulas (Scalia, 2013). Os capilares não são inervados e devido ao pouco conteúdo em músculo liso não dilatam (Turner, 1992). É aqui, na rede de capilares, que geralmente se efetuam as trocas entre o sangue e os compartimentos teciduais (Scalia, 2013).

Em circunstâncias normais, o fluxo sanguíneo é controlado pelo equilíbrio entre a pressão hidrostática e a pressão oncótica do plasma e tecidos, sendo o fluido normalmente perdido ao nível da terminação arterial e reabsorvido ao nível da terminação venular. Na microvasculatura ele é em grande parte controlado pela resistência ao afluxo pelas arteríolas pré-capilares e pela resistência ao escoamento pelas vénulas pós-capilares (Turner, 1992).

A inflamação aguda inicia-se com eventos vasculares que decorrem com alterações da hemodinâmica da microvasculatura e que se tornam aparentes 15 a 30 minutos depois da injúria ao tecido (Bartold e Narayanan, 1998) e que duram aproximadamente 24 horas (Majno, 1998). As arteríolas sofrem uma vasoconstrição transitória, produto da estimulação direta da musculatura lisa vascular pelo agente agressor, que geralmente se resolve em poucos segundos ou minutos. Seguidamente há vasodilatação das mesmas mediada por substâncias como prostaciclina e PGs (Wild e col., 2010) que vão induzir o aumento da rede de capilares e vénulas pós-capilares (Turner, 1992). Como consequência há o aumento rápido do fluxo sanguíneo e da pressão hidrostática em todos os vasos, provocando rubor e calor localizados (Bartold e Narayanan, 1998). Este aumento da temperatura ao nível do micro-ambiente cria um ambiente hostil à permanência de micro-organismos.

De um modo geral, pode considerar-se esta vasodilatação e resultante hiperémia como produtos da resposta inicial das arteríolas à lesão e à rápida libertação de mediadores vasoativos como histamina, bradiquinina, neuropeptídeos, PGs e óxido nítrico (NO) produzidos por mastócitos, macrófagos, fibroblastos, células parênquimatosas e por células endoteliais (Holzer, 1998) que vão atuar sobre a musculatura lisa vascular (Newton e Dixit, 2012).

Devido a este aumento de fluxo, a pressão hidrostática intravascular aumenta nas extremidades arterial e venosa (Bartold e Narayanan, 1998) e, acompanhando o aumento de permeabilidade vascular, o fluido primeiro e as proteínas plasmáticas depois, extravasam para o espaço extravascular. Este fenómeno está, no entanto, fundamentalmente confinado à região das vénulas pós-capilares (Granger e Kubes, 1994; Ohashi e col., 1996), apesar das arteríolas também contribuírem para o transporte de proteínas plasmáticas para os tecidos (Sarelius e col., 2006).

A velocidade de escoamento para o compartimento extravascular é demasiado rápida para que possa haver reabsorção atempada pelos vasos linfáticos, não sendo possível evitar o desenvolvimento do edema (Turner, 1992).

Num processo inflamatório que decorre normalmente, o extravasamento de fluido atinge o máximo em 5 a 10 minutos, resolvendo-se em seguida. Mas quando as células endoteliais são destruídas, tal como acontece nas queimaduras, o extravasamento pode persistir até que os vasos lesados sejam reparados ou sofram trombose (Bartold e Narayanan, 1998; Schmid-Schönbein, 2006).

Este fluido extravasado é rico em proteínas como o Fibronogénio e imunoglobulinas (Igs) que não são reabsorvidas nas extremidades venosas devido à alta pressão hidrostática, pelo que um exsudato rico em proteínas fica acumulado no interior do tecido lesado. Com o tempo, este exsudato pode passar a conter também células e detritos celulares e a contínua acumulação destes elementos contribuirá eventualmente também para o edema presente (Bartold e Narayanan, 1998).

Qualquer estímulo nocivo ativa os recetores nocitivos aferentes, levando à despolarização e libertação da taquiquinina substância P (SP, *substance P*) e do Peptídeo relacionado com gene da calcitonina (CGRP, *calcitonin gene-related peptide*). A SP é largamente responsável pela vasodilatação, pela alteração da permeabilidade endotelial (Carmichael e col., 2008) e pelo extravasamento das proteínas do plasma num processo conhecido como inflamação neurogénica (Lembeck e col., 1992).

Após ativação dos nociceptores, a SP é libertada e vai-se ligar ao recetor neuroquinina-I presente nos vasos sanguíneos (Andrews e col., 1989), o que leva à formação de pequenas fendas nas paredes dos vasos que permitem o extravazamento de plasma (McDonald, 1994). A SP também atua sobre os mastócitos e os leucócitos, estimulando a secreção por estes de histamina, serotonina e PGs que têm um papel importante na manutenção do extravazamento prolongado (Schmelz e Petersen, 2001).

Os terminais aferentes primários contêm também CGRP que é libertado após estimulação e ativação. Este produz vasodilatação e potencia os efeitos da SP, contribuindo também para a resposta inflamatória neurogénica (Carmichael e col., 2008).

A libertação de mediadores químicos como a histamina e a bradiquinina associada a libertação de PGE2 e Prostaglandina F $\alpha$  (PGF $\alpha$ ), bem como de Prostaciclina (Wild e col., 2010), durante todo este processo também é responsável pela sensibilização dos nociceptores e consequentemente pela hiperalgesia no local da agressão (Juan, 1981; Moriyama e col., 2005). A dor tem aqui um papel fundamental, dado que obriga à diminuição da atividade desta parte do corpo que se encontra lesada.

De um modo geral, este exsudato inflamatório tem um papel positivo na resposta de defesa, protegendo o hospedeiro contra a infeção e promovendo a reparação e cicatrização do tecido afetado. Ele contém, entre outros, as proteínas necessárias à ativação da cascata do complemento que levará à lise celular; contém anticorpos bactericidas; opsoninas que ao recobrir material estranho, permitem que ele seja reconhecido para fagocitose; Fibrina que gera uma barreira contra a infeção (Bartold e Narayanan, 1998); nutrientes para as células epiteliais e fornece o ambiente húmido necessário à reparação (Cutting, 2003).

O papel das células endoteliais é aqui de relevante importância e apesar da sua heterogeneidade, de um modo geral elas atuam na homeostase da resposta imune, regulando o tipo e quantidade de leucócitos que transmigram para o espaço intersticial (Danese e col., 2007). A morfologia e permeabilidade da parede endotelial dos vasos sanguíneos em diferentes órgãos é variada e mesmo a libertação de mediadores, a apresentação de antígenos e a resposta a tensões varia com o tipo de órgão e o tipo de vaso sanguíneo (Pries e Kuebler, 2006).

Em situações normais, a camada de células endoteliais que recobre a parede dos vasos atua como uma barreira passiva semipermeável que permite a difusão de fluido e pequenas moléculas hidrofílicas, mas não a passagem de moléculas maiores como as proteínas plasmáticas (Turner, 1992). No entanto, a sua capacidade de controlar a passagem de macromoléculas e de fluido entre o sangue e o espaço intersticial é fundamental na criação de gradientes proteicos necessários ao equilíbrio de fluidos e moléculas entre os tecidos, o que é particularmente relevante no caso da Albumina, proteína *chaperone* de substâncias hidrofóbicas vitais ao organismo (Mehta e Malik, 2006). No entanto, nesta fase da inflamação, o extravasamento de fluido, por si só, não justifica a presença de um exsudato rico em proteínas.

De um modo geral, o mecanismo que permite o aumento da permeabilidade envolve eventos de sinalização transmembranar e reações do citoplasma das células endoteliais a mediadores inflamatórios, à adesão dos leucócitos ao endotélio, ao aumento da tensão tangencial do fluido atuando sobre a membrana endotelial ou ao estiramento das células devido à obliteração dos vasos e estase no lado venoso (Zilberberg e Harris, 2001a; Zilberberg e Harris, 2001b). Assim, não só os mediadores inflamatórios como a histamina e os leucotrienos agem sobre as células endoteliais induzindo um aumento da permeabilidade vascular (Newton e Dixit, 2012), mas para tal contribuem também as alterações da tensão tangencial.

Os vasos sanguíneos são “tubos” distensíveis e a velocidade do sangue altera-se num sentido radial, alcançando o seu máximo no centro e zero junto à parede vascular (Long e col., 2004). Inversamente, a tensão tangencial é maior junto à parede dos vasos e nula no centro. Devido a esta e à viscosidade do fluido, camadas adjacentes de fluido movimentam-se a velocidades diferentes, originando uma força de arrasto (Sundd e col., 2013).

O fluxo sanguíneo através dos vasos sujeita as células endoteliais a uma tensão tangencial (Woolhouse e col., 2005) que em situações normais é superior à força de adesão dos leucócitos (Jin e col., 2012). Mas, durante um processo inflamatório, o aumento da tensão tangencial induz a remodelação do citoesqueleto e a ativação de cascatas de sinalização, o que inclui nomeadamente a ativação do NF- $\kappa$ B e a regulação positiva da ICAM-1 (Petzold e col., 2009).

A tensão tangencial exerce, deste modo, um controlo regulador da inflamação através da ligação de fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B e o Egr-1 (*Early growth response protein 1*; Zif268, *Zinc finger protein 225*; NGFI-A, *Nerve growth factor-induced protein A*) a elementos de resposta à tensão tangencial (SSREs, *shear stress response elements*) (Khachigian e col., 1995; Khachigian e col., 1997).

A contração das células endoteliais, principalmente ao nível das vénulas pós-capilares, através da despolimerização da sua proteína contráctil Actina como resposta a mediadores químicos como a PGE2 e a PGF $\alpha$  (Wild e col., 2010), leva ao afastamento lateral da Catenina  $\alpha$ , da Catenina  $\beta$ , da Catenina  $\gamma$  e da Caderina vascular endotelial (VE-Caderina) nas junções intercelulares (Ionescu e col., 2003). Há, deste modo, a criação rápida de poros/lacunas entre elas, mais propriamente lacunas verticais e fissuras oblíquas, facto que contribui para o aumento da permeabilidade vascular (McDonald e col., 1999). Contudo, sabe-se que pode haver um atraso de algumas horas quer na abertura das junções quer no aparecimento das lacunas, facto que está dependente da natureza e intensidade do estímulo antagonista (Turner, 1992).

A perda de proteínas plasmáticas para o espaço extravascular permite a chegada de sistemas enzimáticos do plasma ao tecido lesado que, ao levar também ao aumento da pressão oncótica, contribui conseqüentemente para uma maior perda de fluido pelo compartimento vascular (Turner, 1992). De um modo geral, as junções intercelulares tornam-se a juntar ao fim de 15 a 30 minutos por repolimerização dos feixes de Actina (Ionescu e col., 2003).

O aumento da permeabilidade vascular e a migração transendotelial de leucócitos da circulação para o espaço intersticial, apesar de serem passos importantes da resposta inflamatória aguda, são fenómenos independentes. Além do aumento de permeabilidade ocorrer muito antes da transmigração dos leucócitos, o diâmetro das lacunas criadas não é suficientemente grande para permitir, por si só, a transmigração leucocitária (Muller, 2014).

### **1.2.2. Eventos celulares**

Os eventos vasculares são seguidos de eventos celulares, nos quais os leucócitos após aderirem a endotélio, migram em apenas 20 a 30 minutos para o compartimento extravascular (Ohashi e col., 1996).

O aumento de permeabilidade, com o conseqüente extravasamento de fluido e proteínas do plasma, traduz-se também num aumento da concentração de eritrócitos dentro dos vasos da rede capilar, o que promove o aumento de viscosidade e congestão vascular (Turner, 1992).

Os leucócitos, maiores e mais rígidos, apresentam um fluxo mais marginal e centrífugo do que os eritrócitos, movimentando-se na periferia dos vasos sanguíneos. Aqui acabam eventualmente por contactar o revestimento endotelial da parede vascular num processo chamado marginação leucocitária (Bartold e Narayanan, 1998). Neste processo, os leucócitos colidem e tendem a ser empurrados pelos eritrócitos de menor tamanho, no momento em que o diâmetro das vénulas é 50% superior ao diâmetro dos leucócitos (Granger e Kubes, 1994), permitindo o início do processo de adesão.

A força do fluxo sanguíneo induz nos leucócitos um movimento rotacional e estes sofrem rolamento, uma adesão de baixa afinidade, por ação dos recetores de adesão Selectina-P, Selectina-E (CD62E, ELAM-1) e Selectina-L (Granger e Kubes, 1994; Atarashi e col., 2005). Estas ligações estabelecem-se rapidamente, mas são reversíveis; e é o constante estabelecer e desfazer destas que permite o rolamento dos leucócitos.

A membrana citoplasmática na superfície dos leucócitos encontra-se enrugada sob a forma de microvilosidades. Durante o rolamento, quando as microvilosidades são tracionadas por uma força que aumenta progressivamente ao longo do tempo, formam-se *tethers* que se estendem em sentido oposto ao do fluxo. Quando se desligam do endotélio, os *tethers* não se retraem mas, devido ao rolamento, são lançados no sentido do fluxo originando *slings*. Ambos os elementos estruturais contribuem para a estabilidade do rolamento sob a ação de elevadas tensões superficiais (Sundd e col., 2013).

As plaquetas, também elas maiores e mais rígidas que os eritrócitos, devido à ligação da sua Selectina-P ao respetivo ligando sofrem rolamento, passando também a deslocarem-se a uma velocidade menor que os eritrócitos (Frenette e col., 1995).

Este evento pode traduzir-se na obstrução dos microvasos e no desacelerar da circulação ao nível dos capilares, o que ocasionalmente pode levar à estase. O aporte nutricional aos tecidos, nestas circunstâncias, pode ficar de tal modo comprometido que pode ocorrer isquémia e eventualmente necrose dos mesmos (Turner, 1992).

Após a marginação, os leucócitos organizam-se em linha, tornam-se achatados e aderem de um modo estacionário ao endotélio num processo chamado pavimentação (Bartold e Narayanan, 1998). Os neutrófilos que estão a sofrer rolamento deformam-se, adquirindo a forma de lágrima devido ao facto de se alongarem na sentido do fluxo pela ação da força de arrasto hidrodinâmica. Como são células com um volume constante, este alongamento achata-os, facilitando o rolamento em situações de tensão tangencial alta. Esta forma mais achatada aumenta a sua superfície de contacto com a parede endotelial, elevando a probabilidade de ocorrer a ligação entre a Selectina-P e a PSGL-1 (Sundd e col., 2013).

Nesta fase, as células endoteliais libertam fatores quimiotáticos que reprimem a expressão da adesão pelas selectinas e estimulam a expressão da adesão pelas integrinas  $\beta 2$  dos leucócitos. As principais integrinas envolvidas são a CD11a/CD18 (LFA-1,  $\alpha L\beta 2$ , *Leukocyte function antigen-1*, *Lymphocyte function-associated antigen-1*) e a CD11b/CD18 (Mac-1,  $\alpha M\beta 2$ , Recetor do complemento 3, *Macrophage-1 antigen*, *Membrane-activated complex-1*) que interagem com a ICAM-1 e outras estruturas das células endoteliais (Smith, 1993a; Smith, 1993b; Atarashi e col., 2005), permitindo a ligação dos leucócitos ao endotélio num fenómeno chamado adesão firme de maior afinidade (Bartold e Narayanan, 1998).

Assim, os neutrófilos expressam moléculas de adesão como a Selectina-L e pelo menos dois membros da família das integrinas  $\beta 2$ , fundamentais no desencadear da resposta inflamatória aguda ao participarem na expressão da adesão e transmigração através do endotélio e no reconhecimento e fagocitose dos organismos opsonizados (Simon e col., 1999).

As quimiocinas têm aqui um papel importante, uma vez que medeiam o processo no qual as integrinas  $\beta 2$  são induzidas a adquirir a sua conformação de alta-afinidade através de recetores acoplados à proteína G (GPCRs, recetores G-acoplados, *G protein-coupled receptors*), particularmente os recetores  $G_{\alpha i}$ -acoplados (Campbell e Butcher, 2000).

A adesão dos leucócitos às células endoteliais ocorre, deste modo, através de uma série de interações específicas entre moléculas de adesão complementares presentes nos leucócitos e nas células endoteliais: selectinas, integrinas e ICAMs pertencentes à família das imunoglobulinas (Bartold e Narayanan, 1998). Estas famílias de múltiplas proteínas, cada uma com a sua função específica, são responsáveis pela sinalização do tráfico dos leucócitos.

Os locais preferenciais da adesão de leucócitos na microcirculação periférica estão também predominantemente ao nível da região das vénulas pós-capilares (Zakrzewicz e col., 1997; Zarbock e Ley, 2008), havendo pouco ou nenhum envolvimento das arteríolas. Estes locais, onde ocorre rolamento e adesão firme, estão fisicamente separados do resto da microcirculação, podendo, no entanto, ocorrer áreas de sobreposição. Na circulação periférica, a retenção dos leucócitos e a obliteração dos capilares ocorre basicamente durante períodos de inflamação e de ativação leucocitária (Schmid-Schönbein, 2006).

A adesão firme dos leucócitos é seguida pela projeção de pseudópodos citoplasmáticos, resultantes da reorganização da Actina e de outras proteínas do citoesqueleto, através das lacunas do endotélio, sendo este um dos sinais visíveis da ativação das células inflamatórias. Esta projeção pode acontecer quer os leucócitos estejam em suspensão quer estejam aderidos ao endotélio ou outros substratos, permitindo que a célula se movimente. Quando expostos a agentes antagonistas, a taxa de projeção dos pseudópodos leucocitários depende da concentração destes agentes (Zhelev e col., 2004).

A formação de pseudópodos nas vénulas é facilitada pela estase (Moazzam e col., 1997), mas a sua adesão e a sua dispersão pelo citoplasma na presença de fluxo sanguíneo pode ocorrer desde que os leucócitos tenham sido pré-estimulados por um mediador inflamatório (Fukuda e col., 2000). Também deste modo, os mediadores controlam não só a adesão e a capacidade de resposta à tensão tangencial do fluido sanguíneo, mas também a migração dos leucócitos ao longo de toda a membrana endotelial (Fukuda e col., 2000).

Para transmigrarem, os leucócitos movimentam-se através dos espaços intercelulares do endotélio, desalojando células como péricitos e fibroblastos (Walker e col., 1995). No entanto, quando a inflamação ocorre por exposição a uma endotoxina como o fMLP, os neutrófilos inserem os seus pseudópodos no citoplasma das células endoteliais, percorrendo um trajeto transcelular (Hoshi e Ushiki, 2004).

De referir que os eritrócitos não têm a capacidade de se locomoverem, pelo que a sua passagem através das paredes vasculares é passiva através de lacunas suficientemente grandes que permitam a sua migração, facto que tem como consequência a criação de hemorragias microvasculares (Schmid-Schönbein, 2006).

A libertação de proteinases pelos leucócitos, particularmente Elastase (Ionescu e col., 2003) e metaloproteinases como a Gelatinase A (MMP2) e Gelatinase B (MMP9) no caso dos neutrófilos (Chakrabarti e Patel, 2005; Stefanidakis e Koivunen, 2006), que degradam a membrana basal, vai posteriormente permitir que aqueles se exteriorizem rapidamente do lúmen dos vasos por diapedese chegando ao compartimento extravascular (Murphy, 2012).

Na maior parte dos tecidos, o recrutamento dos leucócitos ocorre, tal como visto, numa sequência concreta desde a sua captura até ao rolamento, seguido da diminuição sistemática da velocidade de rolamento até à adesão e por último a transmigração (Springer, 1994) que ocorre em apenas 1 a 2 minutos (Muller, 2014).

### **1.2.3. Quimiotaxia**

Quimioatratantes são mediadores hidrossolúveis fundamentais da defesa imunitária do hospedeiro, participando no recrutamento de células inflamatórias. Através deles, os leucócitos respondem a estímulos quimiotáticos unidireccionais que os guiam até ao local da inflamação.

Os quimioatratantes apresentam uma grande variedade química, estando neles incluídos lípidos bioativos como leucotrienos, fragmentos proteolíticos das proteínas plasmáticas, quimiocinas e citocinas (Serhan e col., 2008). Esta grande versatilidade permite que eles executem um controlo sensível do tráfico de leucócitos, no qual quimioatratantes efetuando funções sequenciais guiam as células imunes recrutadas até ao

tecido inflamado (Sadik e Luster, 2012). Nomeadamente, os peptídeos IL-8, C5a e fMLP (Ohashi e col. 1996) são ativadores da quimiotaxia atuando predominantemente nos leucócitos durante a inflamação.

Todas estas moléculas induzem quimiotaxia através da ativação dos recetores de sete domínios transmembranares GPCRs que se encontram expressos nas células imunes. Os GPCRs são a mais prolífica família de proteínas da membrana celular, com aproximadamente 800 membros responsáveis pela modelação de diversas respostas celulares à maioria dos neurotransmissores e hormonas que atuam no corpo humano. Os GPCRs efetuam a transdução de sinais extracelulares, ativando vias de transdução de sinal intracelulares através da ativação da proteína G sua constituinte (Heng e col., 2013).

No que diz respeito às quimiocinas em particular, estas são pequenos polipeptídeos, contendo cisteína, que apresentam atividade quimiotática para leucócitos como monócitos, linfócitos T ativados e neutrófilos (Laudanna e col., 2002).

Tanto as quimiocinas nos tecidos como os seus recetores nos leucócitos estão expressos de um modo sobreposto e atuam em conjugação e sequencialmente no recrutamento e navegação dos leucócitos. Isto permite-lhes o controlo apurado e seletivo da resposta imune, nomeadamente quer através do recrutamento de sub-populações leucocitárias quer através do controlo do posicionamento correto destas no micro-ambiente inflamatório (Campbell e Butcher, 2000).

#### **1.2.4. Mesênquima**

A migração dos leucócitos através do espaço intersticial é um elemento importante da normal função das células do sistema imune, quer inato quer adaptativo. O seu papel de patrulhadores exige que eles se movimentem rapidamente através de complexas matrizes extracelulares a velocidades tão altas quanto 20 a 30 µm por minuto (Lam e Huttenlocher, 2013).

A mobilidade intersticial envolve ciclos de motilidade e paragem determinados por informações externas que são traduzidas em sinalização intracelular (Lam e Huttenlocher, 2013) e ocorre na ausência de interações adesivas com as células circundantes.

A migração dos leucócitos é, tal como visto, um processo complexo, controlado por um amplo conjunto de moléculas de adesão presentes nos leucócitos e nas células endoteliais e exigindo a presença de moléculas quimioatratantes.

Tal como referido anteriormente, as células inflamatórias são atraídas até ao lugar da lesão por quimiotaxia, ocorrendo a migração unidirecional das células na direção de um aumento de gradiente de um agente quimiotático (Bartold e Narayanan, 1998). Tanto os mediadores quimiotáticos como os fatores de crescimento são responsáveis por uma migração celular polarizada, sabendo-se também que a sinalização pela Fosfatidilinositol-4,5-biofosfato 3-cinase/Akt (PI3Ks, *Phosphoinositide 3-kinase*) e pelas Rho guanosina trifosfatases (Rho GTPases, *Rho guanosine triphosphatases*) estão envolvidas no controlo da motilidade celular (Rickert e col., 2000). Do mesmo modo, a estimulação pelo peptídeo bacteriano fMLP, pelo Leucotrieno B4 e pelo Fator ativador de plaquetas (PAF, *Platelet-activating factor*) aumenta significativamente a taxa de migração dos leucócitos ativados relativamente à dos leucócitos extravasculares não estimulados (Hickey e col., 2000).

Assim, após a apropriada interação recetor-ligando, os PMNs ficam polarizados e sofrem uma ativação parcial necessária à quimiotaxia ou ficam totalmente ativados para efectuarem a fagocitose e desgranulação ao nível dos tecidos (Stefanidakis e Koivunen, 2006).

As integrinas são os principais mediadores das interações entre as células e o mesênquima da matriz extracelular. Nas células migratórias, as integrinas são os principais recetores transmembranares que permitem as interações entre os ligandos celulares e a Actina do citoesqueleto, influenciando todo o mecanismo de

sinalização. Conjuntamente com estas, recetores multifuncionais da superfície celular como sindecanos (Lendorf e col., 2011), o Recetor hialuronato (CD44) (Hart e col., 2012) e recetores com domínio discoidina (DDR, *discoidin domain receptors*) (Ruiz e Jarai, 2012) coordenam a ligação do ligando ao citoesqueleto e a sinalização intracelular (Schmidt e Friedl, 2010).

Após a rutura da membrana basal, os leucócitos movimentam-se através do endotélio desalojando células como fibroblastos e péricitos, tal como referido anteriormente (Walker e col., 1995), extravasam para o espaço intersticial onde encontram a matriz extracelular que funciona como *scaffold*, influenciando a sua adesão, migração, ativação e retenção. Aqui eles movimentam-se através da ligação às fibras extracelulares de Colagénio, ligação essa que envolve um mecanismo associado à família de integrinas  $\beta 1$  (Werr, 1998) que exige particularmente a indução da Integrina  $\alpha 2 \beta 1$  (VLA-2) (Werr e col., 2000).

Após penetração da membrana basal, também os monócitos migram através da matriz extracelular dos tecidos inflamados onde se podem eventualmente diferenciar em macrófagos tecidulares (Palframan e col., 2001).

Os ligandos dos recetores de adesão são outra célula; partículas multiméricas; macromoléculas proteicas e glicoproteicas imobilizadas nos tecidos como Colagénios, Fibronectina, Vitronectina, Fibrinogénio e Laminina; ou macromoléculas não proteicas como proteoglicanos e o polissacarídeo hialurano (Schmidt e Friedl, 2010).

As integrinas reconhecem particularmente proteínas *scaffold* como o Colagénio intersticial (Takada e col., 2007), enquanto o CD44 liga-se preferencialmente a polímeros de carboidratos extracelulares como glicoproteínas, glicosaminoglicanos e ácido hialurónico (Thorne e col., 2004).

### **1.2.5. Resolução da inflamação aguda**

A resolução da resposta inflamatória aguda, após a qual se volta a estabelecer um estádio tecidual homeostático, é um mecanismo altamente regulado e independente dos mecanismos anti-inflamatórios (Serhan e col., 2007).

Nela ocorre nomeadamente a transição da síntese de PGs pró-inflamatórias para a síntese de lipoxinas anti-inflamatórias indutoras de resolução (Medzhitov, 2010). Esta transição envolve também a alteração no recrutamento das células inflamatórias que deixam de ser neutrófilos e passam a ser monócitos, o que resulta na depuração das células mortas e de detritos presentes no local e no início da reparação tecidular (Serhan e Savill, 2005).

As lipoxinas, que são eicosanóides derivados do ácido araquidónico, têm potentes ações anti-inflamatórias e pró-resolução (Serhan e col., 2008). Elas participam no mecanismo da resolução uma vez que retardam a entrada de novos neutrófilos no local da inflamação, reduzem a permeabilidade vascular, promovem a infiltração de monócitos com fenótipo não inflamatório que é necessário à resolução e estimulam os macrófagos a digerir e depurar os neutrófilos apoptóticos (Godson e col., 2000; Serhan e col., 2008).

A resolução da inflamação aguda envolve também a ativação de outros percursores de ácidos gordos presentes nos exsudatos como os ácidos gordos omega-3 polinsaturados, ácido docosahexanóico (DHA) e ácido eicosapentanóico (EPA). Cada precursor é transformado através de mecanismos enzimáticos em famílias de compostos bioativos chamados resolvinas, respetivamente série-E e série-D, que atuam como mediadores químicos locais na regulação da duração e magnitude da inflamação (Serhan e Savill, 2005; Serhan e col., 2008).

No caso particular da cavidade oral, em estudos efetuados em doentes com periodontite verificou-se que a Resolvin E1 reduz a produção de superóxido pelos neutrófilos em resposta quer ao TNF- $\alpha$  ou ao fMLP (Serhan e col., 2008).

### **1.2.6. Morte celular e fagocitose**

A cascata de inflamação é acompanhada quer por morte celular programada (apoptose) quer por necrose celular, cuja magnitude depende da natureza bioquímica e da quantidade do estímulo inflamatório. A morte celular está também dependente das atividades fisiológicas e metabólicas. Nomeadamente ao nível das fibras musculares, aquelas que primeiro são sujeitas a morte são as que apresentam uma baixa taxa de metabolismo oxidativo, o que implica a presença de um baixo número de enzimas *scavenger* de radicais livres de oxigénio (Schmid-Schönbein, 2006).

As células inflamatórias que invadiram o tecido lesado são também alvo de apoptose. Normalmente, os neutrófilos têm um tempo médio de vida de 6 a 10 horas, após o que sofrem apoptose e consequente depuração no baço (Bicknell e col., 1994) ou fagocitose *in situ* por macrófagos e fibroblastos (Hall e col., 1994).

No entanto, estudos experimentais com recurso a neutrófilos marcados demonstraram que os que se encontram extravasados têm uma média de vida consideravelmente mais longa do que aqueles que ainda se mantêm em circulação. Variadas citocinas e mediadores quimiotáticos presentes durante a inflamação prolongam a sobrevivência dos neutrófilos, pelo que 24 horas depois do início da resposta inflamatória é possível detetar no local da lesão uma grande quantidade desta população celular ainda presente, muito para além da finalização do influxo de células inflamatórias que é observado após uma a quatro horas (Bicknell e col., 1994). Este facto está dependente do GM-CSF libertado pelas células endoteliais ativadas e aumenta a capacidade de sobrevivência dos neutrófilos, permitindo-lhes presumivelmente funcionarem de um modo mais eficaz nos locais de inflamação (Coxon e col., 1999).

A apoptose é teoricamente considerada uma via fisiológica de morte celular imunologicamente silenciosa, nas quais as células em decurso de apoptose são detetadas pelos fagócitos. Durante este processo, a membrana celular mantém-se intacta, pelo que as moléculas DAMP citotóxicas contidas no interior dos neutrófilos não são libertadas no local (Krysko e col., 2011).

Os neutrófilos apoptóticos tornam-se não funcionais e perdem a capacidade de se moverem como resposta a mediadores quimiotáticos, sendo incapazes de gerar a libertação de ROS ou de desgranular. Este facto ocorre por perda de funcionalidade das suas vias de ativação ou por incapacidade de se ligarem aos ligandos devido à diminuição dos recetores de superfície. Estes neutrófilos inativados são subsequentemente fagocitados (Akgul e col., 2001).

Os corpos apoptóticos podem inibir a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias e promover a secreção de citocinas anti-inflamatórias pelos fagócitos, induzindo as células apresentadoras de antígenos a apresentá-los de modo a promoverem tolerância imunitária (Zitvogel e col., 2010).

O reconhecimento destas células apoptóticas pelos macrófagos não se traduz na libertação por estes de mediadores pró-inflamatórios, mas sim de mediadores anti-inflamatórios como a IL-10 e TGF- $\beta$  (Huynh e col., 2002), o que lhes confere um fenótipo anti-inflamatório, permitindo-lhes uma atividade conducente à resolução do processo inflamatório. Deste modo, a depuração por fagocitose de células e corpos residuais apoptóticos nem sempre é imunologicamente neutra, uma vez que ela pode resultar em potentes efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores (Saville e col., 2002).

Se, pelo contrário, ocorre necrose ou se há pouca expressão da atividade fagocítica dos macrófagos, há perda de integridade da membrana citoplasmática das células em processo de morte e os produtos citotóxicos são libertados, agravando a lesão dos tecidos e potenciando o processo inflamatório (Lawrence e Gilroy, 2006; Plataki e col., 2006).

Os neutrófilos e os macrófagos têm a capacidade de reconhecer e ingerir partículas estranhas, após o reconhecimento de carboidratos presentes na superfície destas partículas por recetores de fucose e manose. Contudo, o seu recobrimento por opsoninas como o Fragmento do complemento C3b, Fibronectina do plasma ou o Anticorpo IgG, exponencia a capacidade fagocitária daqueles. Os neutrófilos fagocitam uma partícula opsonizada em menos de 20 segundos, enquanto que os macrófagos necessitam de alguns minutos para efetuar a sua fagocitose (Turner, 1992; Bartold e Narayanan, 1998).

Apesar de num modo geral se considerar que só os neutrófilos e macrófagos participam na fagocitose, alguns autores consideram que também os fibroblastos participam na fagocitose de neutrófilos apoptóticos através do recurso à Integrina  $\alpha V\beta 3$  e aos recetores lectina-like que reconhecem também alterações no conteúdo de carboidratos da superfície das células apoptóticas. A molécula de adesão fagocitária CD36 opera conjuntamente com a  $\alpha V\beta 3$  para ligar a Trombospondina que é secretada pelos fagócitos, estabelecendo a ligação entre os recetores e as estruturas da superfície dos neutrófilos apoptóticos (Akgul e col., 2001).

A fagocitose pelos neutrófilos de partículas opsonizadas acelera a sua apoptose, principalmente pela via da Mac-1 que é dependente de radicais de oxigénio gerados pela enzima Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPH oxidase). Este é um mecanismo eficaz de remoção de neutrófilos extravasados que atingiram o fim da sua vida útil, impedindo a libertação de DAMPs citotóxicas (Coxon e col., 1996).

O mecanismo de fagocitose, através do qual agentes antagonistas, células apoptóticas e detritos são removidos, é um processo dependente de energia que exige três fases distintas: (1) uma vez que os neutrófilos e os macrófagos têm na sua superfície recetores capazes de reconhecer DAMPs e PAMPs, este reconhecimento e subsequente ligação é o primeiro passo da fagocitose (Turner, 1992; Bartold e Narayanan, 1998). (2) Após ligação ao corpo opsonizado, este é ingerido. A membrana citoplasmática envolve o material e vacuoliza-o para formar o fagosoma. (3) À medida que este é transportado ao longo do citoplasma vai-se fundindo com os lisosomas mais próximos formando o fagolisosoma, o que permite a libertação no seu interior de enzimas lisosomais, de proteínas catiónicas e de ROS capazes de degradar a maior parte dos constituintes celulares (Turner, 1992; Bartold e Narayanan, 1998; Serhan e col., 2008).

A fagocitose está associada a um aumento de atividade metabólica, durante a qual a morte celular e a degradação dos corpos estranhos pode ser efetuada de um modo oxigénio-dependente e/ou de um modo oxigénio-independente. A morte celular oxigénio-dependente é extremamente eficaz e potente envolvendo a ativação da via das pentoses fosfato e a NADPH oxidase, o que se traduz num aumento do consumo de oxigénio que é metabolizado e reduzido ao seu anião superóxido ( $O_2^-$ ) (Turner, 1992; Bartold e Narayanan, 1998).

Nos neutrófilos, o  $O_2^-$  é espontaneamente convertido pela superóxido dismutase em peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) que na presença da mieloperoxidase granular e de haletos é convertido em iões hipohaletos altamente reativos e tóxicos como o ácido hipocloroso (HOCl), produto final da oxidação (Turner, 1992; Bartold e Narayanan, 1998).

A morte celular oxigénio-independente recorre ao pH ácido, enzimas lisosomais e complemento, mecanismo cuja atividade bactericida é potenciada pelas proteínas catiónicas e a Lactoferrina (Bartold e Narayanan, 1998).

Os produtos do processo de desgranulação são transportados até ao citoplasma e incorporados em macromoléculas ou ainda mais metabolizados. O material não digerido é mantido no fagosoma, cujas membranas são recicladas através da membrana citoplasmática (Turner, 1992).

Quando finalizam a sua atividade fagocitária, os neutrófilos apoptóticos e não apoptóticos que enviam sinais “comam-me” são fagocitados pelos macrófagos. Igualmente, também os macrófagos apoptóticos são fagocitados pelos macrófagos saudáveis que não são destruídos e continuam a sintetizar mediadores inflamatórios. Já os eosinófilos e basófilos não participam no mecanismo da fagocitose (Bartold e Narayanan, 1998).

### 1.2.7. Inflamação crónica

A eliminação do agente antagonista ou do estímulo inflamatório leva ao fim da síntese e ao catabolismo dos mediadores pró-inflamatórios como eicosanóides, quimiocinas, citocinas ou moléculas de adesão; o que parará o recrutamento de mais células inflamatórias para a área afetada, permitindo o início da resolução da inflamação aguda (Lawrence e Gilroy, 2006).

A depuração dos leucócitos inflamatórios inclui, tal como já referido, a apoptose local dos PMNs ou linfócitos associada à fagocitose por macrófagos com origem hematopoiética (Heasman e col., 2003). Depois de terminada a fagocitose, os macrófagos podem deixar a área inflamada através de drenagem linfática (Bellingan e col., 2002).

Se estes passos forem cumpridos, a inflamação aguda atingirá a sua resolução sem que haja excessiva destruição e dano tecidual, não havendo também oportunidade para o desenvolvimento de uma inflamação crónica (Lawrence e Gilroy, 2006).

Inevitavelmente, caso não haja resolução da inflamação aguda, estabelecer-se-á uma inflamação crónica. Esta decorre com proliferação, migração e recrutamento de mais células inflamatórias, o que se pode tornar extremamente prejudicial para o tecido normal; remodelação da matriz extracelular e angiogénese (Libby, 2007). Ela é usualmente descrita como uma inflamação prolongada durante a qual coexistem: (1) infiltração por células mononucleares como macrófagos, linfócitos e plasmócitos; (2) a destruição de tecido; (3) tentativas de reparação tecidual, acompanhadas da proliferação de fibroblastos, formação de tecido conjuntivo e eventual fibrose (4) e a formação permanente de neovasos (Bartold e Narayanan, 1998; Majno, 1998). Apesar de se desenvolver em continuidade a uma inflamação aguda, ela inicia-se incidiosamente e é muitas vezes assintomática.

Os infiltrados inflamatórios presentes na inflamação crónica contêm uma população maioritariamente constituída por macrófagos e linfócitos, facto que é característico da resposta imune nesta fase. Estes infiltrados estão também comumente associados à fibrose subsequente a esta inflamação crónica (Johnson e Ziff, 1976).

Os macrófagos, principais células participantes quer na fase final da inflamação aguda quer na inflamação crónica, têm origem em monócitos circulantes ou multiplicam-se localmente por proliferação (Bartold e Narayanan, 1998). Tanto a VCAM-1 como a Selectina-P ligam-se aos monócitos que após a adesão à superfície endotelial migram num processo mediado por fatores quimiotáticos como a Proteína quimioatratante dos monócitos-1 (MCP-1, *Monocyte chemoattractant protein-1*), o C5a, os peptídeos de Fibrina, a Linfocina e fatores de crescimento. Uma vez presentes na íntima arterial e após exposição ao Fator estimulador de colónia de macrófagos (M-CSF, *Macrophage colony-stimulating factor*), eles diferenciam-se em macrófagos e proliferam (Palframan e col., 2001).

Os linfócitos B e T são também células ativas durante a inflamação crónica, durante a qual os linfócitos B ao interagirem com antígenos transformam-se em plasmócitos e passam a sintetizar anticorpos. Os linfócitos T constituídos pelos sub-tipos *killer*, *helper* e regulador estão associados à imunidade celular (Bartold e Narayanan, 1998).

A angiogénese e a remodelação microvascular são componentes intrínsecos da remodelação tecidual nas doenças inflamatórias crónicas. A expansão e aumento da ativação da rede microvascular promove o influxo de mais células imunitárias, pelo que a angiogénese e a inflamação tornam-se processos codependentes (Jackson e col., 1997).

A reestruturação e reconstrução da rede capilar e da microvasculatura podem ocorrer em qualquer momento do processo inflamatório, motivo pelo qual é possível observar simultaneamente diferentes fases de

alteração da rede microvascular. Um evento comum a este fenómeno, dependendo da natureza e duração do estímulo inflamatório, é a permanente reestruturação do endotélio, a qual converte os capilares em vénulas mais largas (Ezaki e col., 2001). Inclusivamente, os capilares podem desaparecer na sua totalidade, num processo chamado de rarefação que é devido fundamentalmente à apoptose das células endoteliais (Vogt e Schmid-Schönbein, 2001).

Contudo, os macrófagos também sintetizam e libertam fatores de crescimento que, ao nível da microcirculação, induzem a formação de novos capilares em torno de agregados de macrófagos. Nomeadamente, o recetor CX3CR1 para as quimiocinas é essencial à formação, integridade estrutural e maturação de neomicrovasos. A morfogénese por vacuolização e tubulação dos monócitos/macrófagos, a tunalização da matriz extracelular e a diferenciação em células de músculo liso são, em parte, induzidas pela interação entre o CX3CR1 e o seu ligando CX3CL1 (Kumar e col., 2013).

Muitas células como queratinócitos, células tumorais, monócitos, macrófagos ou fibroblastos sinoviais são capazes de produzir fatores angiogénicos em condições de hipóxia e de inflamação. Designadamente, as células do sistema monocítico-macrofágico podem ser encontradas em locais onde está a ocorrer angiogénese em situações patológicas. Na realidade, a maior parte dos fatores de crescimento e citocinas que regulam o mecanismo de angiogénese podem ser sintetizados por macrófagos (Sunderkötter e col., 1994).

Também os macrófagos residentes nos tecidos induzem a proliferação, remodelação ou regressão vascular (Frantz e col., 2005); sendo a sua atividade mediada por diversos TLRs em sinergia com recetores adenosina A2A que regulam positivamente a expressão do VEGF (Pinhal-Enfield e col., 2003).

A remodelação da matriz extracelular que rodeia os vasos em formação facilita a angioneúse, uma vez que envolve a degradação da matriz antiga e a deposição de novos componentes (Carmeliet, 2003). A degradação é efetuada por proteínases que incluem ativadores do Plasminogénio como a Urocinase ativadora do plasminogénio (uPA, *Urokinase plasminogen activator*) e o Inibidor do ativador do plasminogénio-I (PAI-I, *Plasminogen activator inhibitor-1*), cuja síntese é Smad-dependente (Datto e col., 1999); metaloproteinases e seus inibidores; heparinases; quimases; triptases e Catepsina (Carmeliet, 2003).

O mecanismo de angiogénese envolve, deste modo, a proliferação, invasão e migração de células endoteliais e a conseqüente formação do tubo vascular. Este processo é induzido por fatores de crescimento vascular que interagem com moléculas da matriz extracelular como integrinas (Eliceiri, 2001).

A ativação da Integrina  $\alpha V\beta 3$  (VnR, Recetor da vitronectina) tem como resultado diferentes estados funcionais que influenciam eventos integrina-dependentes como a migração celular, angiogénese e atividade metástica. Efetivamente, esta integrina tem sido implicada na patofisiologia de tumores malignos, nos quais a sua presença é essencial para a angiogénese tumoral (Felding-Habermann e col., 2001). Assim, sabe-se que a Integrina  $\alpha V\beta 3$  regula positivamente a proliferação e migração das células endoteliais (Mahabeleshwar e col., 2006), encontrando-se expressa durante processos de remodelação vascular. Em modelos experimentais de angiogénese *in vivo* verificou-se que a expressão de  $\alpha V\beta 3$  e  $\alpha V\beta 5$  está relacionada com os fatores angiogénicos principais: a expressão da  $\alpha V\beta 5$  é regulada positivamente pelo VEGF, enquanto que o Fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF, *Basic fibroblast growth factor*) estimula a regulação positiva da  $\alpha V\beta 3$  (Eskens e col., 2003). Deste modo, na angiogénese patológica, a expressão das Integrinas  $\alpha V\beta 3$  e  $\alpha V\beta 5$  nos vasos em proliferação é fundamental, sendo a sua marca distintiva (Mahabeleshwar e col., 2006).

Os neovasos em formação exercem uma regulação positiva sobre recetores para fatores angiogénicos produzidos por células imunes e não imunes locais tais como bFGF, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$ , outros fatores de crescimento, moléculas de adesão, metaloproteinases da matriz bem como componentes da matriz extracelular que contribuem para a ativação e crescimento das células endoteliais (Carmeliet, 2003).

## 2. Inflamação e biomarcadores no movimento dentário

O ortodontista, através da mecânica ortodôntica, inicia um processo inflamatório que vai permitir o movimento dentário ortodôntico controlado. Apesar de uma cascata inflamatória ser um mecanismo de defesa contra uma agressão, no caso concreto das forças ortodônticas, ele vai facilitar a remodelação tecidual que ocorre ao nível do ligamento e do osso alveolar sujeitos a estas forças. Dado que esta inflamação é asséptica, ela deverá em circunstâncias normais evoluir no sentido da reparação dos tecidos afetados, sem que dela permaneçam sequelas (Davidovitch e col., 1997).

A remodelação óssea que ocorre como resposta a uma agressão é o método pelo qual o osso alveolar resiste e se adapta às cargas mecânicas, mas são os efeitos destas ao nível do ligamento periodontal os responsáveis pelo despoletar de todo o mecanismo que está na base do movimento dentário ortodôntico (Diercke e col., 2011; Pavithra e col., 2014). De um modo geral, a reparação final do ligamento periodontal sujeito a lesão não é diferente daquela que ocorre ao nível de outros tecidos conjuntivos (Sismanidou e col., 1996).

Durante o tratamento ortodôntico, a força aplicada é transmitida pelo ligamento ao osso alveolar que flexiona (Pavithra e col., 2014). Concomitantemente há distorção da matriz extracelular e consequente alteração da morfologia celular e da configuração do citoesqueleto do LP (Pan e col., 2014), o que provoca o início do processo durante o qual irá ocorrer a remodelação dos tecidos periodontais: gengiva, cimento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar; bem como da polpa dentária.

A estimulação mecânica é um factor essencial na remodelação de muitos tecidos, pelo que células neles presentes como fibroblastos, células endoteliais e células de músculo liso são sensíveis à aplicação de forças. Estas células são, por isso, capazes de responder à força mecânica, modificando várias das suas funções celulares como proliferação e expressão de componentes da matriz extracelular, o que se traduz numa geral alteração da estrutura, composição e função dos tecidos (Wang e Thampatty, 2006).

As células do ligamento periodontal respondem, deste modo, a dois eventos diferentes: (1) à agressão à matriz extracelular e (2) à aplicação da força mecânica. Os sinais provenientes da aplicação de força são percebidos pelos componentes da matriz extracelular e consequentemente por elementos das membranas celulares, iniciando-se uma cascata que ativa vias de transdução de sinal que levam à expressão genética, transdução e modificações do processo pós-transdução que têm como objetivo a síntese de constituintes da matriz extracelular (Kjaer, 2004; Redlich e col., 2004). A remodelação posterior desta matriz extracelular afetada pela aplicação de forças ortodônticas é um processo altamente complexo que controla a homeostase e reparação do ligamento periodontal, tal como acontece nos outros tecidos conjuntivos (Redlich e col., 2004).

Quando a força aplicada é leve, a deformação do osso alveolar dá-se no primeiro segundo da fase inicial do movimento, dado que o fluido do ligamento periodontal não pode ser comprimido. Após um a dois segundos, o fluido extravasa do ligamento e o dente movimenta-se no interior do alvéolo, provocando no lado do movimento ainda mais compressão do ligamento periodontal, do fluido periodontal e da microvasculatura com a consequente diminuição do fluxo sanguíneo (Cardaropoli e Gaveglio, 2007). No lado oposto ao do movimento, em que há estiramento do ligamento com a criação de uma força de tensão, o fluxo sanguíneo é, de modo geral, mantido ou aumentado, podendo contudo ocorrer uma diminuição transitória caso o estiramento seja exagerado, levando à obliteração dos vasos presentes. Estas alterações da vascularização do ligamento periodontal e do respetivo fluxo sanguíneo estimulam a atividade de substâncias e células que atravessam os vasos sanguíneos da zona atingida e vão formar o exsudato e o infiltrado inflamatório respetivamente (Consolaro, 1999).

São alterações químicas como a mudança do pH do meio, que se torna ácido, que favorecem a chegada e permanência de células clásticas; a diminuição da pressão parcial de oxigénio nas áreas de compressão e o

seu aumento nas áreas de tensão; a alteração do influxo celular dos íons cálcio e sódio; bem como o aumento da síntese e secreção de várias moléculas como neurotransmissores, citocinas, fatores de crescimento, fatores estimuladores de colônias, hormonas ou metabolitos do ácido araquidónico (Krishnan e Davidovitch, 2006; d'Apuzzo e col., 2013).

Estas diferentes moléculas agindo de modo autócrino e parácrino, sempre em associação com outras moléculas sinalizadoras sistémicas e locais, além induzirem a diferenciação e a proliferação celular, vão proporcionar o micro-ambiente favorável à invocação de respostas pelas células periodontais, cujo objetivo final é a reabsorção óssea no lado de pressão e a aposição óssea no lado de tensão (Krishnan e Davidovitch, 2006).

As reações celulares e tecidulares produzidas iniciam-se logo após a aplicação da força. Dado que ocorre compressão e estiramento das fibras e células do ligamento periodontal, no lado de pressão e no lado de tensão respetivamente, é imediatamente despoletado o recrutamento de células progenitoras de osteoclastos e de osteoblastos, bem como a quimioatração de células inflamatórias (Krishnan e Davidovitch, 2006).

Uma vez que o movimento ortodôntico decorre sempre com algum grau de hialinização, há a formação de tecido de granulação após a isquémia, necrose asséptica, hemorragia e subsequente formação do coágulo sanguíneo. Na organização do coágulo vão participar elementos vasculares e nervosos que invadem a área (Parlange e Sims, 1993), bem como novo tecido conjuntivo com a sua componente em fibras de Colagénio, fibroblastos e epitélio juncional (Sismanidou e col., 1996).

Propõe-se que cerca de quatro horas após o início de aplicação da força aos dentes, as modificações no meio químico produzam alterações na atividade das células presentes, nomeadamente o aumento de AMPc (adenosina monofosfato cíclica, *cyclic adenosine monophosphate*) e de GMPc (guanosina monofosfato cíclica, *cyclic guanosine monophosphate*), segundos mensageiros necessários à estimulação da diferenciação celular, cuja expressão está associada à secreção de PGE2 (Davidovitch, 1991). Também a deformação das células da matriz extracelular contribui para este fenómeno, uma vez que leva à libertação de ácido araquidónico da superfície celular, cujo metabolismo pelas vias da cicloxigenase ou da lipoxigenase se traduz na libertação de PGs e leucotrienos que estimulam a libertação dos segundos mensageiros (Cardaropoli e Gaveglio, 2007).

Apesar destes nucleotídeos estarem envolvidos na resposta precoce dos osteoblastos ao estímulo mecânico, sabe-se que esta ocorre com flutuações. Estudos experimentais em gato demonstraram que o AMPc diminui nas primeiras três horas após a aplicação de força, aumentando só por volta das 24 horas, enquanto que o GMPc atinge o seu valor máximo não só às três horas, mas também às 24 horas (Davidovitch e col., 1978).

A distorção da matriz do ligamento periodontal sob a ação de forças ortodônticas e consequente deformação mecânica das suas células, conjuntamente com a anóxia ou a hipóxia criada pelo colapso dos vasos comprimidos promove a libertação de peptídeos livres no meio intersticial. A presença destes, que é também produto da destruição de células do ligamento ou da degradação das fibras de Colagénio e da matriz extracelular, faz com que os mastócitos desgranulem libertando histamina, heparina, serotonina e enzimas (Consolaro, 1999).

O ligamento periodontal apresenta uma intrincada rede nervosa com origem em ramos periféricos do trigémio (nervos alveolar superior e inferior) que o penetram a partir do forame apical e dos canais de Volkmann do osso alveolar, acompanhando os vasos sanguíneos. Todas as fibras nervosas ramificam extensivamente e as células nervosas das suas terminações livres e dos corpúsculos de Ruffini-like estão associadas à nociceção e à mecanorrecepção, particularmente ao tato e pressão (Garant, 2003b). Em condições fisiológicas normais, estes recetores estão quiescentes e contêm vários neuropeptídeos como o SP e o CGRP (Vandevska-Radunovic, 1999).

Sob a aplicação de forças, a distorção da matriz extracelular do ligamento conjuntamente com o deslocamento do fluido periodontal provocam a deformação das fibras nervosas dos nervos periféricos que participam na inflamação neurogénica, estimulando-as então a libertar os neuropeptídeos vasoativos neles contidos como a SP, o Peptídeo intestinal vasoativo (VIP, *Vasoactive intestinal peptide*) ou o CGRP (Hall e col., 2001).

Estes neuropeptídeos provocam vasodilatação, aumentando a permeabilidade vascular; promovem a transmigração de leucócitos e o extravasamento de plasma para o espaço intersticial; estimulam a proliferação das células endoteliais e dos fibroblastos; regulam positivamente a expressão das moléculas de adesão presentes nas células endoteliais e atuam como neurotransmissores ao nível dos nervos sensoriais do ligamento (Hall e col., 2001; Masella e Meister, 2006; d'Apuzzo e col., 2013), estabelecendo a ligação entre o estímulo e a resposta bioquímica.

O CGRP induz a formação de tecido ósseo estimulando a proliferação de osteoblastos e inibindo a atividade dos osteoclastos (Masella e Meister, 2006; d'Apuzzo e col., 2013). A ativação dos seus recetores presentes nos osteoblastos, monócitos, linfócitos e mastócitos traduz-se na amplificação da sinalização intra e intercelular, o que resulta também na síntese e secreção de citocinas (d'Apuzzo e col., 2013).

A SP acumulada no ligamento periodontal liga-se aos seus recetores celulares e, através da interação com as células endoteliais dos vasos da polpa, ligamento e osso alveolar, promove nestes uma rápida vasodilatação. Os eventos vasculares da cascata de inflamação aguda progridem normalmente e as células endoteliais são estimuladas a expressarem moléculas de adesão celular que interagem com os leucócitos circulantes, provocando a adesão destes às paredes dos vasos sanguíneos periodontais e a subsequente transmigração para o espaço extravascular. Aqui, os leucócitos são estimulados a sintetizar e secretar um conjunto de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e moléculas de adesão celular que se difundem pelos tecidos sujeitos à aplicação da carga mecânica (Davidovitch e col., 1997).

A angiogénese e remodelação da rede de vasos sanguíneos do periodonto permitem a adaptação destes ao novo micro-ambiente criado pelas ações mecânicas. Após uma diminuição inicial transitória, o número de vasos periodontais aumenta, tornando-se neste processo inflamatório também uma importante fonte de citocinas e quimiocinas (Anastasi e col., 2008). A citocina chave deste processo é o VEGF que além de induzir angiogénese, estimula também as células endoteliais a expressarem integrinas (Nör e col., 1999).

Aproximadamente 90 minutos após a aplicação da força começa a ficar constituído o infiltrado inflamatório. Os neutrófilos são os primeiros a chegarem ao local da agressão atraídos por estímulos fagocíticos e mediadores quimiotáticos, sendo as células predominantes nas primeiras 24 a 72 horas (Consolaro, 1999). No entanto, como as forças ortodônticas induzem uma resposta inflamatória asséptica (Davidovitch e col., 1997; Teixeira e col., 2010) e a principal função dos PMNs é combater infeções bacterianas, eles não interagem com a força agressora e a expressão do seu fenótipo vai diminuindo progressivamente, acabando por não ocorrer grande destruição quer das células quer dos tecidos afetados (Consolaro, 1999).

Os macrófagos e outros leucócitos mononucleares chegam ao local 8 a 12 horas depois da lesão e tornam-se as células inflamatórias predominantes ao fim de cinco dias. Têm uma vida longa e exercem várias funções, além de estimularem o fenótipo de reparação dos fibroblastos, executam a fagocitose de partículas e secretam substâncias para o meio extracelular como citocinas, fatores de crescimento e derivados do ácido araquidónico (Consolaro, 1999; Nanci e col., 2013).

A hialinização provocada é um lesão tecidual que impede o dente de se movimentar até que todo o tecido necrótico e o osso adjacente sejam removidos por osteoclastos, pelo que o dente atinge um *plateau* que nos humanos dura entre 10 a 20 dias (Rody e col., 2001). No entanto, em modelo experimental em rato verificou-se que o início da hialinização ocorre, no lado da pressão, 24 horas após a aplicação da força e são os macrófagos as células responsáveis pela remoção dos tecidos hialinizados (Zainal Ariffin e col., 2011).

No humano, ao fim de um a dois dias, a inflamação aguda exsudativa é substituída por um processo crónico asséptico que é predominantemente proliferativo, envolvendo fibroblastos, células endoteliais e células da medula óssea alveolar, que persiste até à próxima consulta de controlo ortodôntico, durante a qual torna a ser desencadeado um novo processo de inflamação aguda (Krishnan e Davidovitch, 2006). É ao fim destes dois dias que se torna perceptível o início do movimento ortodôntico (Cardaropoli e Gaveglio, 2007). Na fase tardia

da cascata inflamatória, o infiltrado tem um papel importante na reabsorção de restos celulares e tecidulares e na reorganização e reparação do ligamento periodontal (Ten Cate e col., 2003).

Entre os produtos cuja libertação é induzida pela aplicação de forças ortodônticas encontram-se as PGs, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Andrade e col., 2012). Estas moléculas interagem diretamente com as células do tecido ósseo ou indiretamente através das células presentes nos locais de inflamação como os monócitos/macrófagos, linfócitos e fibroblastos que são estimuladas a secretar também mais citocinas e fatores de crescimento (Uematsu e col., 1996a).

Muitas das moléculas secretadas por estas células estão, então, envolvidas nos processos de reabsorção do tecido ósseo associados ao movimento dentário. Quando se instala um processo crónico, continua a haver transmigração de leucócitos e precursores de osteoclastos com origem hematopoiética para os tecidos periodontais afetados, onde vão modelar o processo de reparação do tecido ósseo (Krishnan e Davidovitch, 2006).

Níveis elevados de expressão de citocinas inflamatórias e dos seus recetores indiciam não só que um processo inflamatório ou um processo patológico está a decorrer, mas que estará ativado o recrutamento de osteoclastos e todo o dispositivo de remodelação óssea (Krishnan e Davidovitch, 2009). Este facto é importante, dado que a taxa de remodelação óssea controla a velocidade e magnitude do movimento dentário (Teixeira e col., 2010).

As células dos tecidos ósseos, osteoblastos, osteoclastos e particularmente os osteócitos (Bonewald, 2007), são sensíveis às ações mecânicas e as alterações adaptativas que ocorrem como resposta a estas podem modificar a massa e a morfologia do tecido ósseo (Rubin e col., 2006).

O Ligando do recetor ativador do NF- $\kappa$ B (RANKL, *Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*) e o M-CSF expressos pelos osteoblastos e osteócitos apoptóticos (Bonewald, 2007) são as mais importantes citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelo recrutamento, diferenciação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos (Boyce e Xing, 2008; Atanga e col., 2011). Estas citocinas atuam através da ligação aos respetivos recetores, Recetor ativador do NF- $\kappa$ B (RANK, *receptor activator of NF- $\kappa$ B*) e c-Fms, que se encontram expressos tanto nos precursores dos osteoclastos como nos osteoclastos maduros, ativando os eventos descritos através da comunicação osteoclasto-osteoblasto (Boyce e Xing, 2008).

Tanto o RANKL como o RANK são membros da superfamília TNF. O RANKL, expresso na membrana citoplasmática de células estromais e de células osteoblásticas, liga-se ao RANK expresso na membrana citoplasmática de células progenitoras de osteoclastos, ativando a sinalização que leva à diferenciação e fusão de células precursoras de osteoclastos e à promoção da atividade e sobrevivência dos osteoclastos maduros (Krishnan e Davidovitch, 2006; Boyce e Xing, 2008). Os osteoblastos secretam também um recetor atrativo solúvel para o RANKL, a osteoprotegerina (OPG), que bloqueia a interação RANKL/RANK, interferindo com a osteoclastogénese e acelerando a apoptose dos osteoclastos maduros (Andrade e col., 2012).

Durante o movimento dentário, o RANKL encontra-se consistentemente expresso na superfície do osso alveolar três dias após a aplicação da força (Nishimura e col., 2008).

A expressão do M-CSF pelas células osteoblásticas estromais é indispensável à diferenciação dos progenitores em osteoclastos. No entanto, só por si, o M-CSF é incapaz de realizar esta função necessitando também da expressão de RANKL pelas células osteoblásticas e estromais e de RANK pelos precursores dos osteoclastos (Boyce e Xing, 2008).

A OPG protege o tecido ósseo, limitando a extensão da reabsorção através da sua ligação ao RANKL, impedindo-o de se ligar ao RANK (Boyce e Xing, 2008). A regulação positiva da sua expressão conjuntamente com a regulação negativa da expressão do RANKL pela citocina anti-inflamatória IL-10, inibe a reabsorção óssea (Ren e Vissink, 2008).

O TNF- $\alpha$  é também uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica envolvida na reabsorção óssea tanto na inflamação aguda como na crônica. De facto, apesar de não ser a citocina principal na osteoclastogênese, o TNF- $\alpha$  é um potente estimulador da formação dos osteoclastos e da reabsorção óssea em situações patológicas do metabolismo ósseo como a artrite reumatóide, nas quais atua principalmente em sinergia com o RANKL (Atanga e col., 2011). Ele é secretado por linfócitos T ativados (Atanga e col., 2011), pelo sistema monocítico-macrofágico, mas também por osteoblastos, células epiteliais e células endoteliais (Aggarwal, 2000). É uma citocina que medeia a apoptose, proliferação celular, imunomodulação, inflamação, replicação viral, alergia, artrite ou choque séptico entre outras condições patológicas (Aggarwal, 2000).

Os efeitos pró-osteoclásticos do TNF- $\alpha$  dão-se por dois processos: (1) diretamente ele atua em sinergia com o RANKL para regular positivamente a formação de osteoclastos a partir de células progenitoras e (2) indiretamente ele induz as células estromais e os osteoblastos a expressarem RANKL, M-CSF e IL-1 (Lam e col., 2000; Lacativa e Farias, 2010; Atanga e col., 2011).

Em aparente contradição, o TNF- $\alpha$  tem também efeitos inibitórios sobre a osteoclastogênese através da indução da expressão dos seus inibidores por diferentes tipos celulares como fibroblastos e osteoblastos. Nomeadamente, a expressão da OPG é regulada positivamente em fibroblastos sinoviais humanos tratados com TNF- $\alpha$  (Kubota e col., 2004).

Tal como o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são citocinas pró-inflamatórias que são sobreexpressas no lado de pressão do ligamento periodontal e osso alveolar adjacente na fase inicial do movimento dentário. Elas são detetadas pouco tempo após a aplicação da força, estimulando a remodelação do ligamento comprimido e a reabsorção do osso alveolar adjacente (Grieve e col., 1994; Lowney e col., 1995); em contrapartida no lado de tensão podem inibir a formação da nova matriz quer ligamentar quer óssea (Grieve e col., 1994).

A IL-1 $\beta$ , produzida principalmente por monócitos ativados, é das duas IL-1 aquela que tem um papel primordial no processo inflamatório, encontrando-se envolvida no metabolismo ósseo, estimulando a reabsorção e deprimindo a deposição (Alhashimi e col., 2001) em resposta a vários estímulos, quer eles sejam mecânicos, hormonais ou inflamatórios (Baba e col., 2011).

A IL-1 $\beta$  é secretada por fibroblastos, macrófagos, cementoblastos, osteoblastos e osteoclastos durante o movimento dentário (Alhashimi e col., 2001). No entanto, ela é particularmente expressa por osteoclastos como resposta imediata à tensão mecânica na fase mais precoce do movimento e por macrófagos acumulados no lado de pressão em fases mais tardias do movimento. Dado que a ativação, fusão e sobrevivência dos osteoclastos estão diretamente relacionadas com a presença da IL-1 $\beta$ , ela também ajuda a determinar a magnitude e a rapidez do movimento dentário ortodôntico dependente da eficácia do mecanismo de remodelação óssea (Teixeira e col., 2010).

Nos fibroblastos está demonstrado que a IL-1 $\beta$  estimula a produção de colagenases, inibe a síntese de Colagénio e induz a proliferação celular (Saito e col., 1991). Assim, na remodelação tecidual que ocorre associada ao movimento ortodôntico, sabe-se que os níveis quer de IL-1 $\beta$  quer de TNF- $\alpha$  são regulados positivamente e que a ausência de sinalização de ambas as citocinas se traduz num movimento dentário menos eficaz (Baba e col., 2011). Nomeadamente, em estudos experimentais em rato, verificou-se que a expressão máxima de IL-1 $\beta$  e IL-6 ocorre, no lado do movimento, três dias depois da aplicação da força (Alhashimi e col., 2001).

A IL-1 $\beta$  é um indutor da secreção da IL-6, sendo as suas ações sobreponíveis quer às da IL-6 quer às do TNF- $\alpha$  (Uematsu e col., 1996a). A IL-6 que apresenta um aumento 24 horas após aplicação da força (Linkhart e col., 1991), regula as respostas imunes nos locais de inflamação e atua de modo autócrino e parácrino, estimulando a osteoclastogênese e a consequente reabsorção óssea (Kurihara e col., 1990).

A IL-1 $\beta$  e a PGE2 apresentam padrões de expressão diferentes durante o movimento dentário ortodôntico (Ren e Vissink, 2008). A IL-1 $\beta$  tem um efeito aditivo na produção de PGE2, dado que a administração *in vitro* de IL-1 $\beta$  leva à secreção de PGE e de AMPc (Saito e col., 1991). O mesmo é demonstrado pelo facto dos

níveis de IL-1 $\beta$  serem os primeiros a aumentar imediatamente após a aplicação da força, isto é, ao longo das primeiras 24 horas, e só posteriormente a associação da IL-1 $\beta$  presente no meio e o stress mecânico induzem sinergicamente a expressão de PGE2. Já os níveis de PGE2 atingem o seu máximo entre as 24 e as 48 horas após a aplicação da força (Grieve e col., 1994; Ren e Vissink, 2008).

Segundo Koyama e colaboradores (2008), no ligamento periodontal comprimido, o aumento da expressão das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 e respetivos recetores, do recetor da IL-8, da IL-11 e TNF- $\alpha$  confirmam que a inflamação é asséptica.

O interferão-gama (IFN- $\gamma$ ), importante indutor do MHC nos macrófagos, é um biomarcador precoce da ativação da imunidade durante a inflamação, estimulando a secreção de outras citocinas como a IL-1 e o TNF- $\alpha$  que induzem a produção de NO, primordial na comunicação osteoblasto-osteoclasto. Durante o movimento ortodôntico, o IFN- $\gamma$  participa na remodelação do periodonto levando nomeadamente à reabsorção óssea provocada pela apoptose das células T efetoras (Alhashimi e col., 2000).

O NO medeia a formação óssea adaptativa, protegendo os osteócitos contra a apoptose e mediando a atividade dos osteoclastos. Nomeadamente, níveis elevados de NO reduzem a atividade osteoclástica, enquanto que níveis baixos traduzem-se em osteoclastogénese e aumento da atividade dos osteoclastos (Hayashi e col., 2002). No fundo, a libertação de NO pelos osteócitos estimula a formação de novo tecido ósseo (Burger e Klein, 1999).

As PGs são também mediadores bioquímicos associados à reabsorção óssea pelos osteoclastos durante o movimento dentário ortodôntico, acelerando-o (Yamasaki e col., 1982). Tal como referido anteriormente, as PGs têm origem no ácido araquidónico libertado pela superfície celular das células sujeitas a forças deformadoras, nomeadamente as forças atuantes durante o movimento ortodôntico. São sintetizadas em resposta à inflamação entretanto desenvolvida e têm uma origem múltipla em células do ligamento periodontal (Saito e col., 1990; Mayahara e col., 2012), em macrófagos (Tanamoto e col., 1990) e em osteoblastos (Rapuano e Bockman, 1991).

As PGs induzem reações inflamatórias como o aumento da permeabilidade vascular e a quimiotaxia e, quando transferidas para um meio *in vitro*, promovem a reabsorção óssea. A PGE2 estimula tanto a atividade osteoblástica (Bergmann e Schoutens, 1995) como a atividade osteoclástica (Grieve e col., 1994; Zhou e col., 1997), está implicada no recrutamento de osteoclastos e estimula a produção de colagenases pelos osteoblastos, pelo que é um mediador importante do movimento dentário (Heath e col., 1984).

Apesar do efeito direto inicial das PGs na atividade osteoclástica ser inibitório, ele é transitório, e após duas a três horas é detetado um aumento da reabsorção óssea. Em estudos efetuados com indometacina, inibidor específico da síntese das PGs, concluiu-se que esta não inibe diretamente os osteoclastos presentes na zona de compressão, mas sim as células mononucleares precursoras dos osteoclastos e numa fase mais tardia, as células mononucleares com fenótipo osteoclasto-like, o que se traduz numa diminuição do recrutamento de novos osteoclastos para a zona (Zhou e col., 1997) e consequentemente num atraso na reabsorção óssea e na libertação enzimática pelos lisosomas. Estes factos sugerem que o recrutamento de osteoclastos é mediado por PGs, enquanto que a atividade dos osteoclastos locais é independente das PGs (Zhou e col., 1997). Deste modo, as PGs intervêm não só no movimento ortodôntico mas também na reabsorção óssea a ele associada, nomeadamente através da modificação da atividade e da quantidade de osteoclastos e das células osteoclasto-like presentes no meio (Grieve e col., 1994).

Durante o movimento, os fatores de crescimento e as citocinas inflamatórias como a IL-1, TNF- $\alpha$  e o TGF- $\beta$  têm a capacidade de estimular a síntese de PGs, quer por si só quer atuando sinergicamente (Saito e col., 1990).

Convém lembrar que a experimentação em humano detetou níveis elevados de IL-1 $\beta$ , SP e PGE2 no fluido crevicular tanto no lado de pressão como no lado de tensão dos dentes movimentados. Contudo, os dados obtidos são contraditórios, uma vez que foram detetados níveis mais elevados no lado de tensão, não estando por isso a expressão destes biomarcadores diretamente relacionada com a reabsorção óssea

a ocorrer no lado de pressão. Mas o facto de ser detetada neste lado do movimento é representativo da atividade biológica que aqui está a ocorrer (Dudic e col., 2006).

As interações entre os mediadores inflamatórios como citocinas e bradiquinina e as PGs na reabsorção óssea são variadas. Tal como referido anteriormente, há primeiro a expressão de IL-1 $\beta$  e só posteriormente de PGE2. Já o efeito da bradiquinina na reabsorção óssea é totalmente dependente das PGs e potencia, no entanto, a síntese destas estimulada pela IL-1 e pelo TNF- $\alpha$ ; a ação do TNF- $\alpha$  é também parcialmente dependente das PGs; enquanto a ação da TGF- $\beta$  é totalmente independente da síntese das PGs (Bergmann e Schoutens, 1995).

No que diz respeito aos odontoblastos, as PGs estimulam quer o recrutamento destes quer a sua atividade ao nível do osso trabecular e cortical, o que se traduz num aumento da remodelação, *turnover* e densidade óssea. A aplicação de forças mecânicas *in vitro* a células osteoblasto-like com origem na calota craniana de ratos, promove o aumento da síntese de ADN e a libertação de PGE2 pelos osteoblastos e a aplicação de cargas dinâmicas a osso esponjoso de origem canina é acompanhada pela expressão de PGE2 e PGI2 pelos osteócitos e osteoblastos (Bergmann e Schoutens, 1995).

As células afetadas pela aplicação da força secretam várias enzimas MMPs como as collagenases e as gelatinases que ao degradarem a matriz extracelular ajudam os osteoclastos a acederem ao tecido ósseo mineralizado (Capelli e col., 2011). Neste processo também são secretados os Inibidores tecidulares das MMPs (TIMPs, *tissue inhibitors of metalloproteinases*) (Bildt e col., 2009).

As MMPs têm um papel primordial na remodelação do ligamento periodontal quer em condições fisiológicas quer em condições patológicas, na qual atuam com coordenação temporal. Nomeadamente, a MMP3 ativa outras MMPs como a MMP8 e a MMP9, as collagenases como a MMP13 dissolvem as fibrilas de Colagénio e as gelatinases como a MMP9 segmentam o Colagénio desnaturado, finalizando a sua degradação (Capelli e col., 2011).

No movimento ortodôntico provocado em ratos, tanto a collagenase I (MMP1), secretada pelos osteoblastos e não pelos osteoclastos, como a catepsina K estão envolvidas na reabsorção óssea, uma vez que degradam a matriz óssea colagénica do tecido ósseo expondo o tecido ósseo mineralizado à ação dos osteoclastos (Domon e col., 1999). A experimentação em humano demonstrou que a sua expressão aumenta uma hora após a aplicação da força, tanto no lado de pressão como no lado de tensão, havendo diminuição subsequente da sua expressão (Cantarella e col., 2006; Bildt e col., 2009).

A MMP2 também se encontra regulada positivamente tanto no lado de pressão como no lado de tensão, apesar de neste lado onde ocorre aposição, os seus valores serem significativamente mais baixos (Bildt e col., 2009). A MMP2 induzida pela compressão do ligamento periodontal aumenta exponencialmente de uma maneira dependente do tempo, atingindo o seu máximo 8 horas após a aplicação da força. No lado de tensão, os níveis de MMP2 aumentam também significativamente uma hora após a aplicação da força, muito embora ao fim de 8 horas retornem aos seus valores normais. Estes dados permitem concluir que a MMP2 é um biomarcador da fase precoce do movimento dentário (Cantarella e col., 2006).

Em humano verificou-se que os níveis de MMP3, MMP9 e MMP13 oscilam no lado de pressão durante todo o período de movimento, enquanto que no lado de tensão as oscilações que ocorrem não são estatisticamente significativas (Capelli e col., 2011). Também em humano, a MMP8 foi detetada no fluido crevicular 4 a 8 horas depois da aplicação da força, sendo um marcador indicativo da remodelação que está a ocorrer no ligamento periodontal (Apajalahti e col., 2003).

O TIMP1 exerce uma função dupla: estimula a reabsorção de tecido ósseo no lado de pressão quando em baixas concentrações e reduz a reabsorção no lado de tensão quando em altas concentrações (Bildt e col., 2009).

As quimiocinas são uma superfamília de citocinas quimiotáticas que atuam como reguladoras quer do processo inflamatório quer do tráfico celular, controlando e direcionando a migração celular, em situações fisiológicas (quimiocinas homeostáticas) e em situações patológicas (quimiocinas inflamatórias). Elas apresentam diferentes resultados biológicos numa maneira dependente do tipo de tecido, do tempo e da localização (Schall

e Proudfoot, 2011), sendo indutoras de processos como a angiogénese, proliferação celular e apoptose (Silva e col., 2007).

Durante o movimento dentário ortodôntico, as quimiocinas são também essenciais ao desenvolvimento, atividade e sobrevivência das células do tecido ósseo, principalmente dos osteoblastos e precursores dos osteoclastos (Bendre e col., 2003).

A secreção da IL-8 (CXCL-8), membro da família das quimiocinas  $\alpha$ /CXC, é efetuada pelos macrófagos, neutrófilos e células endoteliais, entre outros, na resposta inflamatória e na lesão. A sua expressão induzida pela aplicação de forças é dependente da IL-1 $\beta$ , exigindo que a presença desta citocina no micro-ambiente atinja os níveis necessários para que haja expressão (Ren e col., 2007).

No que diz respeito aos efeitos das quimiocinas sobre os osteoclastos, sabe-se que a sua diferenciação é ativada pela interação quimiocina-recetor, mas de um modo dependente da expressão do RANKL (Kim e col., 2006). O facto do RANKL estimular a expressão das quimiocinas MPC-1, MIP-1 $\alpha$  e RANTES pelos osteoclastos, sugere que durante a diferenciação destas células ocorre uma amplificação do sinal através de sinalização autócrina e parácrina, ativando um *loop* contínuo (Kim e col., 2006). Efetivamente, foi detetada uma correlação entre MPC-1, MIP-1 $\alpha$  e RANKL no lado de pressão do movimento, resultando possivelmente numa maior migração e diferenciação de células precursoras de osteoclastos e consequentemente numa maior atividade osteoclástica (Garlet e col., 2008). No entanto, no movimento dentário, há que ter em atenção que se observa a expressão de quimioatratantes para os osteoclastos quer no lado de pressão quer no lado de tensão, independentemente da reabsorção ser predominante no lado de pressão (Garlet e col., 2008).

As quimiocinas podem também ser produzidas pelos osteoblastos durante o movimento ortodôntico, quando estimulados por *stress* mecânico, mediadores inflamatórios ou proteínas dentinárias (Silva e col., 2004; Kim e col., 2006; Brandow e col., 2007). Eles são capazes de expressarem MCP-1, SDF-1 que induz quer a proliferação quer a expressão de Colagénio tipo I, KC, LIX, CINC-1 ou BCA-1, o que permite inferir da importância dos osteoblastos no desenvolvimento da reação inflamatória que ocorre no ligamento periodontal após a aplicação de forças (Garlet e col., 2008). Verifica-se que muitas células imunocompetentes são deste modo atraídas ao ligamento inflamado, onde modelam o metabolismo dos osteoblastos e dos osteoclastos (Vandevska-Radunovic e col., 1997).

No que diz respeito aos fatores de crescimento expressos no movimento dentário ortodôntico, uma última palavra em relação às proteínas morfogenéticas do osso (BMPs, *bone morphogenetic proteins*) que fazem parte da superfamília do TGF- $\beta$ . A ativação dos osteoblastos resultante da força exercida durante o movimento ortodôntico leva a que estes secretem também BMPs. Designadamente, tanto a BMP-2 como a BMP-7 estão envolvidas na diferenciação dos osteoblastos (Nayak e col., 2013).

As BMPs ligam-se a recetores de superfície presentes tanto nas células progenitoras como nos osteoblastos maduros, onde desencadeiam a via de sinalização de sinal que promove a diferenciação das células progenitoras e a ativação dos osteoblastos, respetivamente (Zainal Ariffin e col., 2011).

As BMPs induzem a expressão do Cbfa1/Runx2, um fator de transcrição que regula a expressão dos mais importantes genes expressos pelos osteoblastos, principalmente do gene *BGLAP* que codifica a osteocalcina. O Cbfa1 é um regulador fundamental não só da diferenciação dos osteoblastos, mas também da sua atividade, determinando a taxa e magnitude da deposição óssea efetuada pelos osteoblastos diferenciados (Ducy, 2000). Deste modo, apesar de um grande número de genes controlar o mecanismo da osteogénese, o Cbfa1 é o biomarcador específico que mais precocemente se expressa (Komori e Kishimoto, 1998).

A BMP-2 regula o osterix/Sp7, um fator de transcrição que contém um domínio dedo de zinco essencial à diferenciação dos osteoblastos e à formação óssea (Cao e col., 2005; Matsubara e col., 2008). Esta proteína morfogénica também induz a diferenciação das células do folículo dentário em cementoblastos e osteoblastos (Zhao e col., 2002) e das células progenitoras em osteoblastos e condrócitos (Lee, 1997).

### 3. Biomarcadores da inflamação

A resposta integrada das citocinas a uma infecção ou a uma lesão, num local de inflamação, é complexa e a resposta tecidual está dependente não apenas da sua concentração, mas também da presença concomitante dos seus inibidores naturais e de citocinas anti-inflamatórias (Ostrowski e col., 1999). Estas citocinas anti-inflamatórias facilitam o influxo de neutrófilos, monócitos, linfócitos e outras células que participam na resposta imune inata ou adaptativa, ajudando a eliminar detritos e antígenos e ajudando também na reparação do tecido lesado (Ostrowski e col., 1999).

A indução de uma inflamação aguda é regulada por citocinas pró-inflamatórias induzidas como resposta, por exemplo, ao LPS das bactérias gram negativas e também pelos elementos ativos na resposta dos hospedeiros (Thakur e col., 2002). Nomeadamente, o TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 ou IFN- $\gamma$  são citocinas pró-inflamatórias que medeiam muitos processos fisiopatológicos em infecções severas como a febre, hipotensão, disfunção múltipla de órgãos ou queratite da córnea, recrutando e ativando os PMNs e induzindo enzimas responsáveis pelo dano dos tecidos (Vonk e col., 1998; Thakur e col., 2002).

Estudos experimentais, tanto em animal como em humano, demonstraram que a injeção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ou IL-6 produz uma resposta com fenótipo inflamatório agudo, levando a que estas citocinas sejam denominadas pró-inflamatórias ou inflamatórias. No entanto, dado que a IL-6 por si só é incapaz de induzir inflamação, ela teoricamente deverá ser denominada de citocina responsiva à inflamação (Ostrowski e col., 1999). Já a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que inibe, nomeadamente, a secreção de TNF- $\alpha$  e de IL-1 $\beta$  (Chernoff e col., 1999).

Estas situações decorrem, no entanto, com uma série de mecanismos contra-reguladores como a produção de citocinas anti-inflamatórias que têm como objetivo minorar os efeitos das anteriores. O Antagonista do recetor da IL-1 (IL-1ra, *IL-1 receptor antagonist*) é o antagonista natural da IL-1 $\beta$ , à qual se liga bloqueando os efeitos derivados da estimulação daquela. O aumento da razão entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é um evento primordial em doentes com diabetes tipo I, doença inflamatória intestinal crónica, artrite reumatóide ou artrite de Lyme (Vonk e col., 1998).

As citocinas pró-inflamatórias induzem morte celular através de vias de sinalização complexas e específicas que são ativadas em função da citocina pró-inflamatória em questão, mas também em função da combinação de citocinas às quais as células estão expostas (Souza e col., 2008).

No que diz respeito em concreto ao TGF- $\beta$ , este não se enquadra no conceito de que uma “hormona” tem somente uma função importante, dada a enorme diversidade de respostas dependentes do contexto celular. Apesar de se prever que esta aptidão multifuncional se traduza numa série de complicadas vias de transdução de sinal, o que se verifica na realidade é que o TGF- $\beta$  atua através de uma via aparentemente simples, a via canónica das Smads (Massagué, 2012).

#### 3.1. TGF- $\beta$

O TGF- $\beta$  é uma citocina multifuncional, cujos recetores, ações e efeitos biológicos são sobreponíveis em quase todas as células envolvidas na lesão e reparação tecidual (Sporn e Roberts, 1993).

A superfamília de citocinas TGF- $\beta$  tem um papel fundamental na regulação de uma grande variedade de processos celulares em organismos multicelulares. Os membros desta superfamília estão presentes ubiquamente e praticamente todas as células do organismo expressam e respondem a pelo menos um elemento da família (Shi e Massagué, 2003).

A superfamília do TGF- $\beta$  é formada por duas sub-famílias. Uma é constituída pelo TGF- $\beta$ , Activina, Nodal, Miostatina e Inibina, entre outros; enquanto que a outra sub-família inclui as BMPs, a Hormona anti-mülleriana (AMH, *anti-müllerian hormone*) e muitos fatores de crescimento e diferenciação (Derynck e Akhurst, 2007; Massagué, 2008).

A existência deste alto número de ligandos é justificada pelo desenvolvimento de recetores com padrões sensíveis de ativação, o que é parcialmente conseguido pela regulação diferencial da expressão dos ligandos a partir dos complexos latentes. Deste modo, apesar de múltiplos ligandos ativarem os mesmos complexos recetores e as mesmas vias de sinalização, os padrões diferenciados na expressão desta superfamília são obtidos a partir da combinação de um número limitado de recetores (Feng e Derynck, 2005).

Esta superfamília, sendo produzida e secretada por diferentes tipos de células, intervém na regulação da proliferação, diferenciação, migração, adesão celular e da apoptose; induz a síntese de proteínas da matriz extracelular como a Fibronectina e o PAI-1 em muitos tipos celulares; modela a resposta imunitária; regula a transição epitelial-mesenquimal (EMT, *epithelial-mesenchymal transition*) e tem um papel importante no desenvolvimento embrionário e no desenvolvimento de doenças, particularmente na carcinogénese (Proetzel e col., 1995; Chai e col., 2003; Gordon e Blobel, 2008).

Muitas das funções do TGF- $\beta$  são o resultado de alterações na expressão dos genes alvo e, deste modo, se compreende que as respostas celulares ao TGF- $\beta$  sejam complexas, uma vez que são produto de uma regulação transcricional diferenciada e também de efeitos não transcricionais que dependem do contexto celular e do ambiente fisiológico (Feng e Derynck, 2005). A estimulação celular pelo TGF- $\beta$  produz alterações imediatas na expressão de um grande número de genes e tanto a ativação como a repressão da expressão genética utilizam o mesmo conjunto de Smads (Shi e Massagué, 2003).

Numa lesão em processo de cicatrização, o TGF- $\beta$  pode estimular ou inibir a proliferação celular dependendo do facto da célula alvo ser um fibroblasto ou um queratinócito (Ashcroft e col., 1999); já nas células epiteliais mamárias, o TGF- $\beta$  produz paragem do crescimento ou comportamento metastático, dependendo do nível de atividade do oncogene Ras presente nas células (Oft e col., 1996).

Dado à larga expressão tanto dos ligandos como dos seus recetores, é possível presumir a existência de vários níveis de regulação da atividade biológica mediada pelo TGF- $\beta$ . Os membros da família TGF- $\beta$  atuam como morfogénios induzindo diferentes destinos celulares dependendo das concentrações do ligando (Itoh e ten Dijke, 2007). Efetivamente, a regulação da atividade biológica mediada pelo TGF- $\beta$  passa por variações na quantidade desta citocina produzida por indução da transcrição e translação do gene *TGFB*, pelas diferentes expressões dos seus recetores de sinalização e pelo facto de ele se encontrar ativo ou latente (Khalil, 1999).

### 3.2. TGF- $\beta$ e SMADs

O TGF- $\beta$  além de ativar vias de sinalização não canónica como as vias das proteínas-quinase activadas por mitogénese (MAPK) ERK1/2, da quinase c-Jun N-terminal (JNK, *c-Jun N-terminal kinase*) e p38 $\alpha$  (Chaudhury e Howe, 2009), da PI3K/Akt, da proteína fosfatase 2A, das proteínas da família Rho, bem como a via da proteína de polaridade epitelial Par6 (Li e Flavell, 2008; Yan e col., 2009); ativa também a sinalização canónica Smad através dos seus dois recetores na superfície celular, o que se traduz na regulação da transcrição efectuada pelas Smads (Siegel e Massagué, 2003).

As Smads são mediadores intracelulares da função do TGF- $\beta$ , modelando a sua atividade e atuando como ativadores transcricionais/fatores de transcrição que regulam a expressão de um grande número de genes (Siegel e Massagué, 2003). A plasticidade das proteínas Smad na regulação transcricional, bem como

a diversidade de vias de sinalização Smad-independentes permitem ao TGF- $\beta$  exercer as suas propriedades pleiotrópicas (Li e Flavell, 2008).

Com a delimitação nos finais dos anos 90 de uma via de sinalização central do TGF- $\beta$  que envolve os seus recetores de membrana e os fatores de transcrição Smad, efetores intracelulares da resposta ao TGF- $\beta$  (Feng e Derynck, 2005), tornou-se evidente que a variabilidade das respostas ao TGF- $\beta$  dadas pelos diversos tipos celulares é produto da diferente leitura que estes fazem de uma mesma via de sinalização, de acordo com o contexto celular em que ela se desenvolve, e não resultante da ativação de diferentes vias de sinalização (Siegel e Massagué, 2003).

Apesar de ser uma via de sinalização relativamente simples, as interações combinatórias das suas moléculas efetoras proporciona um alto grau de especificidade, versatilidade e complexidade. As respostas obtidas podem ser quantitativa e qualitativamente reguladas pelas interações com os recetores, pela formação de complexos de Smads, pela formação de complexos das Smads com outras proteínas efetoras como fatores de transcrição específicos do ADN, coativadores ou correpressores e através do *crosstalk* desta via de sinalização com outras vias (Feng e Derynck, 2005).

A capacidade das Smads determinarem a ativação ou repressão da transcrição de um gene alvo em particular é determinada pela presença de cofatores. A grande variedade de cofatores presentes nas células, dependente da sua linhagem, do seu estágio de desenvolvimento e dos sinais ambientais, confere aos complexos envolvendo diferentes Smads a sua capacidade discriminatória, bem como versatilidade no que diz respeito à transcrição e às respostas genéticas. Também, deste modo, se compreende que a resposta mediada pelo TGF- $\beta$  seja lida de diferentes maneiras e dependa do contexto celular (Massagué e Wotton, 2000; Siegel e Massagué, 2003).

O TGF- $\beta$  regula o desenvolvimento embrionário e a homeostase celular principalmente através da via de sinalização canónica mediada pelas Smads, mecanismo que aparentemente é bastante simples e consiste apenas em alguns componentes essenciais. No entanto, a transdução do sinal é finamente regulada quer temporalmente quer espacialmente, a diferentes níveis, através da ativação dos ligandos, pela formação de complexos, pela ativação das R-Smads, pela translocação ou pela transcrição no núcleo. Muitas proteínas que regulam a sinalização da família quer no citoplasma quer no núcleo foram identificadas em associação com os recetores, com os fatores de transcrição Smad recetor-regulados (R-Smads, *receptor-activated Smads*) ou com a Smad mediadora comum (Co-Smad, *common-partner Smad*) (Yan e col., 2009).

Das R-Smads, a Smad2 e a Smad3 são muito similares em termos estruturais e são as proteínas sinalizadoras da via do TGF- $\beta$ . A Smad4 tem uma relação distante com a Smad2 e a Smad3 e forma um complexo heteromérico com aquelas após a ativação pelo TGF- $\beta$  ou pela Activina (Nagarajan e Chen, 2000). Existe ainda uma terceira classe de Smads, as Smads inibidoras (I-Smad, *inhibitory Smads*), cuja expressão regula negativamente a sinalização do TGF- $\beta$ . Nesta via canónica é interveniente a smad7 que se encontra presente no núcleo (Moustakas, 2002) e que não se liga ao ADN (Shi e Massagué, 2003).

Os mamíferos expressam três isoformas de TGF- $\beta$ , conservadas em termos de evolução filogenética, chamadas TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3 que têm propriedades similares *in vitro*, mas comportamentos biológicos distintos *in vivo* (Annes e col., 2003). Estas isoformas são multifuncionais e atuam de modo autócrino, parácrino e algumas vezes endócrino, de modo a regularem diversos mecanismos ativos durante o desenvolvimento, participando também na manutenção da homeostase tecidual no adulto (ten Dijke e Arthur, 2007).

O TGF- $\beta$ 1 no homem, vaca, porco, macaco e galinha é idêntico e entre o homem e o rato há apenas a substituição de um único amino-ácido (Derynck e col., 1986). O mesmo alto grau de conservação encontra-se no TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3 (Gatherer e col., 1990).

As três isoformas do TGF- $\beta$  são sintetizadas a partir de precursores inativos e estão impossibilitadas de se ligarem aos respectivos recetores sem que sejam ativadas. Os TGF- $\beta$ s são secretados pelas células sob uma

forma biológica latente e inativa denominada TGF- $\beta$  latente (L-TGF- $\beta$ ) (Flaumenhaft e col., 1993; Khalil, 1999). De referir que sendo o TGF- $\beta$ I a isoforma mais ubiquamente expressa, a referência ao TGF- $\beta$  nos trabalhos experimentais dizem respeito, de um modo geral, a esta isoforma.

Intracelularmente, os TGF- $\beta$ s sofrem várias fases de processamento, sendo uma das mais importantes a sua digestão proteolítica ao nível do aparelho de Golgi, que origina um dímero no qual: (1) um homodímero é constituído por um pró-peptídeo derivado da pró-região N-terminal chamado peptídeo associado à latência (LAP, *latency-associated peptide*) e (2) o outro homodímero é constituído por um peptídeo derivado da região C-terminal do precursor que corresponde ao TGF- $\beta$  maduro. Ambos os homodímeros encontram-se unidos por ligações não covalentes e a presença da porção LAP facilita a secreção pela célula e mantém o TGF- $\beta$  biologicamente inativo (Nunes e col., 1997; Khalil, 1999; Li e Flavell, 2008).

O armazenamento do TGF- $\beta$  latente na matriz extracelular permite àquele atuar como um sensor que fornece a informação sobre qualquer perturbação do micro-ambiente, despoletando o mecanismo que tem como resposta a reparação, reorganização e reestruturação da matriz. Neste contexto, a proteína de ligação do TGF- $\beta$  latente (LTBP, *latent TGF- $\beta$  binding protein*) atua como o localizador, a LAP como detetor e o TGF- $\beta$  como o efetor. Todos os ativadores identificados do TGF- $\beta$  estão associados a perturbações da matriz extracelular e perante qualquer lesão ou alteração que aqui ocorra, a falha na localização do TGF- $\beta$  latente pela LTBP traduz-se numa sinalização alterada da via (Annes e col., 2003).

Como o TGF- $\beta$  não se pode ligar aos seus recetores na sua forma latente inativa, ele tem que se libertar quer do LAP quer da LTBP, o que é efetuado através de um ativador do TGF- $\beta$  (TA) que ativa a degradação por proteólise do LAP pela Plasmina (Khalil, 1999), Integrina ou Trombina ou a sua alteração conformacional em resposta a sinais ambientais (Nunes e col., 1997; Annes e col., 2003). Remarcavelmente, as células que produzem o TA podem não ser as mesmas que secretam o TGF- $\beta$ , facto que poderá justificar a capacidade desta citocina em integrar sinais de variadas células na regulação das respostas biológicas (Li e Flavell, 2008).

Os efeitos celulares do TGF- $\beta$  são mediados por recetores transmembranares específicos, o tipo I (T $\beta$  RI) e o tipo II (T $\beta$  RII) (Yamashita e col., 1994; ten Dijke e Arthur, 2007; Li e Flavell, 2008), associados num complexo recetor hetero-tetramérico (Yamashita e col., 1994) constituído por duas moléculas T $\beta$  RI (ALK5, *activin-linked kinase 5*) e duas moléculas T $\beta$  RII. A interação do TGF- $\beta$  com o complexo, ativa-o, permitindo a fosforilação de alvos a juzante, o que consequentemente amplifica a sinalização do TGF- $\beta$  (Li e Flavell, 2008).

O betaglicano, também conhecido como recetor do TGF- $\beta$  tipo III, é um proteoglicano ancorado na membrana citoplasmática que aumenta a afinidade do TGF- $\beta$  para os seus recetores, particularmente do TGF- $\beta$ 2 ao T $\beta$  RII (Brown e col., 1999; Shi e Massagué, 2003).

Assim, após a ligação do ligando ao complexo recetor, o T $\beta$  RII transfosforila e ativa por fosforilação o T $\beta$  RI que atua a juzante, permitindo a subsequente propagação do sinal (Shi e Massagué, 2003) através do reconhecimento e fosforilação das R-Smads no C-terminal (Tsukazaki e col., 1998; ten Dijke e Arthur, 2007) (Figura 1.1).

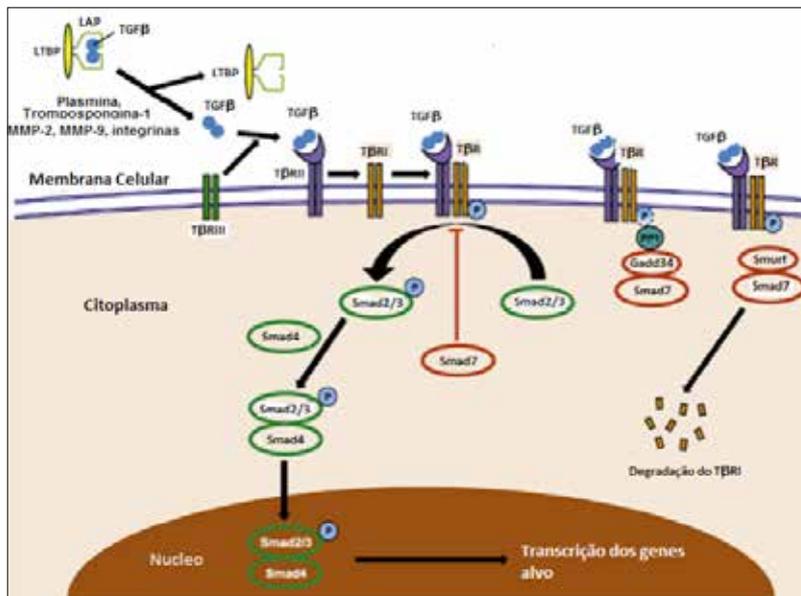


Figura 1.1 – Ativação e sinalização do TGF-β através da via de sinalização canônica das Smads. O TGF-β é secretado como constituinte do complexo latente grande (LCC, *Large latente complex*) que após ativação por proteólise enzimática, o liberta. O TGF-β interage com o Tβ RII que posteriormente fosforila e ativa o Tβ RI. O Tβ RIII promove a interação e afinidade do TGF-β com o Tβ RII. O Tβ RI, por sua vez, vai ativar os transdutores de sinal Smad2 e Smad3, que formam um complexo com a Smad4 e translocam para o núcleo onde modelam a transcrição dos genes alvo. A sinalização é inibida pela Smad7 que pode bloquear a fosforilação da Smad2 ou da Smad3, competindo com elas pela ligação ao Tβ RI. A Smad7 pode levar a desfosforilação do Tβ RI ao interagir com a proteína paragem do crescimento e lesão do ADN (GADD34, *growth arrest and DNA damage protein*) que recruta a proteína fosfatase 1 (PPI, *protein phosphatase 1*). A Smad7 recruta a Smurf que degrada o Tβ RI. Adaptado de Biancheri e col., 2014.

De referir que as R-Smads são reconhecidas e ativadas pelo Tβ RI e pelos recetores tipo I da Activina e do Nodal, enquanto que a Smad1, Smad5 e Smad8 são reconhecidas e ativadas pelos recetores tipo I da sub-família das BMPs e Fatores de crescimento da diferenciação (GDFs, *Growth differentiation factors*) (Shi e Massagué, 2003).

As fosfoserinas do domínio C-terminal das R-Smads são também reconhecidas pelo domínio MH2 de outra Smad, o que leva à sua homo-oligorização ou à hetero-oligorização com uma Smad única dos mamíferos, a Co-Smad ou Smad4 (Moustakas, 2002; Brown e col., 2007). Deste modo, quando ativadas, as R-Smads formam complexos heteroméricos com a Smad4 e acumulam-se no núcleo onde vão participar no controlo transcrricional dos genes alvo (Massagué e Gomis, 2006).

A Smad4 não é fosforilada como resposta ao TGF-β, mas é primordial na formação da maior parte dos complexos transcripcionais das Smads (Siegel e Massagué, 2003). A Smad4 está ancorada ao citoplasma através de proteínas *scaffolding* como a proteína I associada ao recetor do TGF-β (TRAP-1, *TGF-β receptor-associated protein-1*) que suporta positivamente a oligomerização R-Smad/Smad4 (Moustakas, 2002; Chaudhury e Howe, 2009).

No seu estado basal de monómero não fosforilado, a Smad2 e a Smad3 conseguem ligar-se a diversas proteínas, entre elas a SARA (*Smad anchor for receptor activation*), uma proteína associada à membrana citoplasmática que as mantém ancoradas no citoplasma através de microtúbulos e proteínas de ligação à Actina como a Filamina (Moustakas, 2002). Deste modo, a SARA interage diretamente com as Smads, recrutando-as para o complexo recetor do TGF-β e controlando a sua localização subcelular (Tsukazaki e col., 1998).

Mutações da SARA levam a alterações na localização subcelular das R-Smads e inibem as respostas transcripcionais dependentes do TGF-β, o que permite concluir que uma correta localização destas no citoplasma

é essencial à sinalização do TGF- $\beta$ , tornando a SARA um componente de controlo primordial desta via de sinalização (Tsukazaki e col., 1998).

Assim, o recrutamento pela SARA da Smad2 e da Smad3 permite a ligação destas ao T $\beta$ RI. Este passo é essencial para a transdução do sinal, uma vez que a conformação das R-Smads é alterada (Moustakas, 2002), há diminuição da sua afinidade para a SARA (Siegel e Massagué, 2003), o que leva à sua rápida dissociação quer do recetor quer da SARA. A alteração conformacional das R-Smads, retira-lhes a sua auto-inibição, permitindo a formação de complexos heteroméricos com a Co-Smad (Brown e col., 2007).

Após a sua dissociação da SARA e do recetor e consequente formação de complexos Smad2/Smad4 e Smad3/Smad4, estes translocam para o núcleo, passo requerido para que haja uma transdução de sinal eficiente (Tsukazaki e col., 1998; Brown e col., 2007).

Na sua chegada ao núcleo os complexos R-Smad/Smad4 são recebidos por proteínas parceiras específicas para cada tipo de célula em determinadas condições. São estes parceiros que determinam quais as sequências de ADN que se ligarão aos complexos R-Smad/Smad4, quais os coativadores ou correpressores que serão recrutados, com quais fatores de transcrição adicionais os complexos cooperarão e durante quanto tempo todo o processo demorará. É este conjunto de parceiros das Smads e de reguladores presentes numa dada célula no momento em que ocorre estimulação pelo TGF- $\beta$  que determinará a resposta dada e que definirá, em termos moleculares, o contexto celular (Massagué e Wotton, 2000) (Figura 1.2).

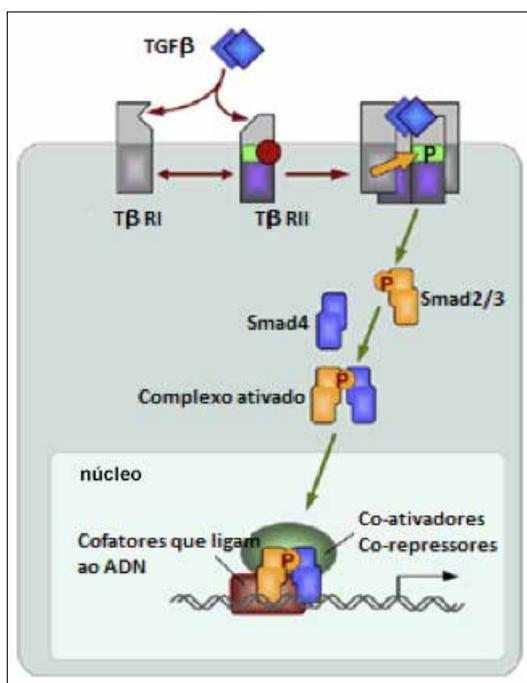


Figura 1.2 – O TGF- $\beta$  liga-se ao T $\beta$  RII que ativa o T $\beta$  RI. Este por sua vez, fosforila as R-Smads, libertando-as do citoplasma e permitindo a sua translocação para o núcleo sob a forma de complexos com a Smad4. No núcleo a interação das Smads com os cofatores, coativadores e correpressores determinará quais os genes que serão reconhecidos pelos complexos.

Adaptado de Massagué e Gomis, 2006.

As vias de sinalização do TGF- $\beta$  são, deste modo, reguladores essenciais de processos biológicos, promovendo o crescimento tecidual e morfogénese. Dado que apresentam funções e papéis específicos em processos como a vasculogénese e a angiogénese que ocorrem durante o processo embrionário (Siegel e Massagué, 2003), qualquer alteração que ocorra, quer por mutação genética quer por variação na expressão

das suas moléculas constituintes traduz-se frequentemente em doença. A íntima e fina regulação destas vias de sinalização é exigida em todos os níveis, particularmente no que diz respeito aos ligandos, dado que quer o excesso quer a deficiência na sua expressão resulta em situações patológicas (Gordon e Blobel, 2008).

Ao regular o crescimento celular, a principal função do TGF- $\beta$  é atuar como um potente inibidor ou supressor do crescimento de uma grande variedade de tipos celulares, nomeadamente das células epiteliais, nas quais limita a proliferação e induz a diferenciação através de um programa citostático de respostas genéticas (Massagué e Gomis, 2006; Brown e col., 2007). Neste caso, o TGF- $\beta$  é a típica citocina anti-mitogénica que fornece sinais citostáticos à maior parte das células epiteliais, neurais e imunes (Massagué e col., 2000).

Nas células normais, os efeitos citostáticos sobrepõem-se aos sinais mitogénicos e os efeitos citostáticos do TGF- $\beta$  são produto da sua regulação negativa da progressão do ciclo celular através da indução dos inibidores das cinases ciclino-dependentes (CDKs, *Cyclin-dependent kinase*) críticas na transição G1-S, *p15INK4b* e *p21Cip1*; e da repressão do fator de transcrição promotor do crescimento e proliferação *c-Myc* (Siegel e Massagué, 2003; Kim e col., 2005; Massagué e col., 2005).

O TGF- $\beta$  pode ativar as respostas genéticas citostáticas em qualquer fase do ciclo celular, mas como estas afetam principalmente os eventos da fase G1, células que tenham ultrapassado este ponto de restrição não cessarão o ciclo celular em progressão (Massagué e Gomis, 2006).

Esta função regulatória torna-se evidente nos casos de proliferação de células tumorais que perderam a sua capacidade de responder aos efeitos repressores do TGF- $\beta$  na proliferação celular (Nagarajan e Chen, 2000). A perda deste elemento controlador tem como consequência a contínua proliferação celular e progressão e expansão do tumor (Hartsough e Mulder, 1997).

A atuação do TGF- $\beta$  manifesta-se, deste modo, na manutenção de um constante estado de equilíbrio no mecanismo de crescimento, nunca esquecendo que muitos dos efeitos citostáticos estão dependentes da sua concentração. A concentração nuclear das Smads fornece uma medida direta e proporcional da concentração externa do TGF- $\beta$ , facto que pode ser essencial ao estabelecimento de gradientes de sinalização responsáveis pelo controlo preciso do destino das células alvo (Attisano e Wrana, 1998).

### 3.3. TGF- $\beta$ , Smads e EMT

No que diz respeito particularmente às células epiteliais, o TGF- $\beta$  regula o crescimento, diferenciação e a transformação epitelial nos mecanismos que decorrem nas etapas da carcinogénese, cicatrização e embriogénese (Bhowmick e col., 2001). Assim, o TGF- $\beta$  estimula a proliferação das células mesenquimatosas e inibe o crescimento das células epiteliais (Yan e col., 2009), endoteliais e linfóides (Flaumenhaft e col., 1993). A EMT induzida pelo TGF- $\beta$  é indispensável ao desenvolvimento de estruturas derivadas das CCNs, do coração e de estruturas craniofaciais; sendo um mecanismo regulado temporal e espacialmente (Chaudhury e Howe, 2009).

O desenvolvimento embrionário é produto de um conjunto de interações genéticas, extremamente bem ordenadas e sequenciais, que vão determinar a proliferação e diferenciação de cada tipo celular e a consequente organogénese, de um modo específico no tempo e específico do tecido (Chai e col., 1999; Chai e col., 2003). Isto implica que a ativação de um programa genético em organismos multicelulares tenha de ser rigidamente controlada e a família do TGF- $\beta$  é responsável por um variado número de sinais que efetuam esse controlo (Massagué e Wotton, 2000).

Durante etapas específicas da embriogénese, algumas células epiteliais apresentam uma maior plasticidade, sendo capazes de se movimentarem entre o estado epitelial e o estado mesenquimal através dos mecanismos

de EMT e de transição mesenquimal-epitelial (MET, *mesenchymal-epithelial transition*). Após o desenvolvimento final dos tecidos epiteliais, as células epiteliais aqui presentes são capazes de alterar o seu fenótipo através do mecanismo de EMT, o que lhes permite transdiferenciarem, convertendo-se em derivados mesenquimatosos.

Durante o desenvolvimento e a idade adulta, este mecanismo continua presente em associação com a reparação de tecidos lesados e em situações patológicas como as associadas à inflamação e carcinogénese. Ele demonstra ser um método eficaz de dispersar células num embrião, produzir células mesenquimatosas em tecidos lesados e é uma via que inicia e controla o comportamento metastático e invasivo dos tumores epiteliais (Kalluri e Weinberg, 2009).

Convém lembrar que a regulação positiva da EMT pelo TGF- $\beta$  está dependente da sinalização pela família RhoA, pequenas GTPases responsáveis pela regulação do citoesqueleto de Actina e da estabilização das junções das caderinas nas fibras de stress. A sinalização do TGF- $\beta$  é capaz de desestabilizar as junções da Caderina E e induzir o rearranjo do citoesqueleto e a motilidade celular (Bhowmick e col., 2001).

Os fatores de transcrição Smad2 e Smad3 têm um papel importante na EMT mediada pelo TGF- $\beta$ , que através deles tem a capacidade de promover a paragem do ciclo celular e de induzir EMT em células da mesma linha celular (Brown e col., 2004). Em linhas celulares epiteliais verificou-se que a Smad3 tem um papel mais importante como mediador chave da sinalização citostática dependente TGF- $\beta$  do que a Smad2, nomeadamente através de efeitos na paragem do ciclo celular. Além disso, a Smad2 não é um efetor neste programa citostático, o que é demonstrado pelo facto da diminuição da sua expressão por interferência ao nível do ARN, não diminuir as respostas genéticas citostáticas induzidas pelo TGF- $\beta$ , não se observando paragem do ciclo celular em G1 nem a inibição do crescimento sendo, bem pelo contrário, qualquer uma destas respostas exponenciada (Kim e col., 2005). Quando a ativação da Smad2 e o aumento da sua atividade transcricional em resposta ao TGF- $\beta$  são potenciadas pela repressão da expressão da Smad3, não se observa o correspondente aumento dos efeitos citostáticos mediados pelo TGF- $\beta$ , mas a citostase é quase completamente eliminada (Kim e col., 2005).

A ausência de expressão da Smad2 ou da Smad3 resultante da deleção dos respetivos genes *Smad* em rato revelou a diferente função que ambas têm no desenvolvimento embrionário. A perda homozigótica de mutações funcionais do gene *Smad2* por deleção dos domínios MH1 ou MH2 resulta na morte embrionária devido a falha no estabelecimento do eixo ântero-posterior, não sendo os embriões capazes de expressar o disco germinativo tridérmico ao não entrarem na gastrulação, havendo, por isso, falha na formação da mesoderme (Nomura e Li, 1998; Weinstein e col., 1998; Datto e col., 1999).

Estes eventos demonstraram ser controlados por sinais dependentes da Smad2 vindos da endoderme (Waldrup e col., 1998; Heyer e col., 1999). Verificou-se que os ratos mutantes *Smad2* que ainda permaneceram vivos algum tempo após a gastrulação apresentavam diversas malformações como ciclopia, anomalias cranianas e alterações de padrões morfológicos do bolbo cardíaco e de flexão do embrião. Em contraste, ratos que apresentavam deleções homozigóticas do gene *Smad3* eram viáveis e sobreviveram por vários meses (Heyer e col., 1999). A mesma situação foi demonstrada com ratos *Smad3 null* que sobreviveram até à idade adulta, apesar de serem mais pequenos que os *wild-type* da mesma ninhada e apresentarem penetração incompleta de anomalias da formação articular (Datto e col., 1999). Estes factos são pertinentes, indicando que a Smad3 é dispensável ao desenvolvimento e viabilidade embrionária (Heyer e col., 1999).

Esta função diferenciada da Smad3 em relação à Smad2 poderá estar relacionada com o facto de algumas das funções exercidas por aquela durante a embriogénese poderem ser redundantes ou poderem ser compensadas pela sinalização da Smad2 (Datto e col., 1999). Por outro lado, a Smad3 aparenta ter um papel mais importante como efetor nos tecidos adultos, bem como nos eventos patológicos mediados pelo TGF- $\beta$  e estar menos envolvida na sinalização que ocorre durante a embriogénese (Ashcroft e col., 1999; Datto e col., 1999).

Também foi demonstrado que ratos com distúrbios da *Smad4* apresentavam um fenótipo letal numa fase embrionária precoce, não tendo os seus embriões capacidade de entrarem em gastrulação e expressarem marcadores mesodermiais, apresentando também um desenvolvimento endodermal anómalo (Datto e col., 1999; Chai e col., 2003).

### 3.4. TGF- $\beta$ , Smads e embriogénese craniofacial

A maior parte das células da região craniofacial, nomeadamente aquelas que dão origem ao esqueleto facial, à musculatura lisa e à inervação sensorial, derivam das células das CCNs. As CCNs pós-migratórias podem diferenciar-se nesta variedade de tipos celulares em função de interações epiteliais-mesenquimais específicas. Fatores de crescimento como o TGF- $\beta$  ou fatores de transcrição como o *Msx1* e *Msx2* estão implicados na especificidade e destino final destas células (Chai e col., 2003). Deste modo, a sinalização do TGF- $\beta$  tem funções importantes nestes eventos participando, por exemplo, na palatogénese, mediando a proliferação e diferenciação celular e formação de matriz extracelular através da regulação a jusante de genes alvo (Iwata e col., 2012).

As isoformas TGF- $\beta$  têm, então, um papel fundamental durante a embriogénese, designadamente durante a morfogénese craniofacial. A presença do TGF- $\beta$  foi detetada no mesênquima durante as interações críticas epiteliais-mesenquimais que ocorrem durante a formação dos órgãos dentários ou da cartilagem de Meckel durante a morfogénese mandibular (Chai e col., 2003). Todas as isoformas intervêm durante a palatogénese (Fitzpatrick e col., 1990; Nawshad e col., 2004), sendo particularmente importante o TGF- $\beta$ 3, cuja inibição impede a fusão normal dos processos palatinos (Brunet e col., 1995; Proetzel e col., 1995; Cui e col., 2003; Prime e col., 2004). As isoformas TGF- $\beta$  participam também no desenvolvimento mandibular, regulando a condrogénese e osteogénese, determinando consequentemente a formação da cartilagem de Meckel, côndilo e apófise coronóide (Oka e col., 2007).

O TGF- $\beta$  tem um papel primordial na modelação da embriogénese precoce, sabendo-se que murghanos TGF- $\beta$  *null* não sobrevivem *in utero*, apresentando uma vasculogénese e hematopoiese defeituosas (Dickson e col., 1995). O TGF- $\beta$  é de entre os fatores reguladores dos condrócitos o mitogénio mais potente, promovendo a condrogénese através do aumento seletivo da proliferação de condrócitos derivados das CCNs e da produção de matriz extracelular adicional (Ito e col., 2002), mas inibindo simultaneamente a sua diferenciação terminal e a mineralização (Talley-Ronsholdt e col., 1995; Alvarez e col., 2001).

Durante o desenvolvimento da cartilagem de Meckel, a via de sinalização do TGF- $\beta$  é mediada pela *Smad2*, mas não a *Smad3*, tendo-se demonstrado que níveis baixos de *Smad2* não permitem a transmissão do sinal do TGF- $\beta$ , retardando a formação da cartilagem de Meckel (Ito e col., 2002). O colapso da via de sinalização do TGF- $\beta$  traduz-se em múltiplas anomalias como uma mandíbula de menores dimensões sem ângulo goníaco (Ito e col., 2002).

De referir que o pericôndrio tem um papel fundamental na regulação da formação endocondral mediada pelo TGF- $\beta$ . A remoção dos recetores deste aqui presentes afeta a capacidade da via de sinalização de modelar a proliferação e diferenciação dos condrócitos, o que se traduz eventualmente no subdesenvolvimento e malformação da cartilagem de Meckel (Alvarez e col., 2001).

O recetor do T $\beta$  RII do TGF- $\beta$  está especificamente expresso nos estádios de condensação, proliferação e diferenciação do desenvolvimento do osso mandibular, sendo por isso um elemento fundamental da regulação da osteogénese (Janssens e col., 2005). Também o T $\beta$  RII está expresso no mesênquima palatino derivado das CCNs, estando demonstrado que mutações do seu gene *TGFBR2* são responsáveis pela síndrome multissistémica de Loey-Dietz que inclui malformações craniofaciais como fenda do palato (Iwata e col., 2012).

A experimentação em rato demonstrou que a ablação condicional do gene *Tgfb2* resulta em fenda do palato com uma penetrância fenotípica de 100%, havendo uma regulação negativa da expressão da Ciclina D1 e a diminuição da proliferação das CCNs no mesênquima palatino (Iwata e col., 2012). Do mesmo modo, ratos com alteração do *Tgfb2* apresentam defeitos severos nos ossos craniofaciais, particularmente na mandíbula, evidenciando que a sinalização do TGF- $\beta$  é fundamental na proliferação das células ósteoprogenitoras (Oka e col., 2007).

O TGF- $\beta$  é também um mediador na cicatrização de tecidos, sendo uma das citocinas osteotrópicas que regulam a remodelação local do tecido ósseo. Tanto as três isoformas como os dois recetores têm funções fundamentais quer na ossificação endocondral quer na ossificação intramembranosa (Chen e col., 2012). Designadamente, a formação de tecido ósseo mediada pelo TGF- $\beta$  é efetuada através de quimiotaxia que recruta células progenitoras de osteoblastos, da estimulação da sua proliferação e da promoção dos estádios precoces de diferenciação associados à produção de proteínas da matriz extracelular (Janssens e col., 2005). Este processo decorre com a estimulação quer da expressão do Colagénio tipo II quer da síntese de proteoglicanos pelos percursores de condrócitos e com a supressão da proliferação dos percursores das células de origem hematopoiética como os osteoclastos. Assim se compreende que o TGF- $\beta$  seja uma citocina primordial na formação do tecido ósseo quer durante a embriogénese quer na manutenção da sua homeostase ao longo da vida (Janssens e col., 2005).

O TGF- $\beta$  afeta tanto a proliferação como a diferenciação tardia da linha celular osteoblástica, inibindo ou bloqueando a mineralização óssea sem alterar o crescimento celular (Breen e col., 1994; Tally-Ronsholdt e col., 1995; Alliston e col., 2001). Ele inibe também a expressão da atividade da ALP, a expressão da Osteocalcina, da Osteopontina e das collagenases (Breen e col., 1994; Harris e col., 1994; Alliston e col., 2001), muito embora esteja demonstrado que a Smad3 estimula tanto a expressão da ALP como a mineralização (Sowa e col., 2002).

Sabe-se que a diminuição de atividade da ALP é diretamente proporcional à concentração de TGF- $\beta$  presente no meio e inversamente proporcional à atividade mitogénica, fenómeno que é observado em células jovens em divisão rápida e não em células maduras bem diferenciadas e formadoras de nódulos (Harris e col., 1994).

Os estádios tardios de diferenciação são regulados por outros fatores de crescimento como as BMPs (Canalis e col., 2003). Mas a cascata de sinalização do TGF- $\beta$  é complexa. A apoptose dos osteoblastos é bloqueada pelo TGF- $\beta$ , permitindo a sua transdiferenciação em osteócitos (Jilka e col., 1998). Por outro lado, o TGF- $\beta$  através da Smad3 visa também o Cbfa1/Runx2, um fator de transcrição específico dos osteoblastos, com o objetivo de inibir a transcrição do gene *BGLAP* da Osteocalcina e conseqüentemente suprimir a diferenciação dos osteoblastos. Este efeito da Smad3 é específico quer da célula quer do promotor (Massagué e col., 2005; Lian e col., 2012). De referir que o TGF- $\beta$  é também responsável pelo aumento da incidência da apoptose dos osteoclastos, minimizando assim as perdas ósseas (Hughes e col., 1996).

### 3.5. TGF- $\beta$ e cavidade oral

O TGF- $\beta$  é essencial à manutenção da homeostase do complexo dentina-polpa quer durante o desenvolvimento dentário quer durante a reparação da polpa dentária após lesões. Estudos *in vitro* demonstraram que tanto o TGF- $\beta$ 1 como o TGF- $\beta$ 3 conseguem estimular os efeitos dentinogénicos dos odontoblastos. Estas isoformas têm também efeitos mitogénicos na população de células subodontoblásticas e quando o TGF- $\beta$ 3 estava presente detetou-se a indução de diferenciação de células odontoblasto-like (Sloan e Smith, 1999). Também durante o desenvolvimento dentário, as interações epiteliais-mesenquimais são responsáveis pela sinalização

dos eventos que ocorrem, desde a iniciação da formação do dente até à diferenciação dos odontoblastos responsáveis pela secreção de dentina e dos ameloblastos responsáveis pela secreção de esmalte (Smith, 2003).

Na cavidade oral, estudos experimentais determinaram que as células do ligamento respondem ao TGF- $\beta$  através do aumento da síntese quer de proteínas quer de ARN *in vivo* (Mailhot e col., 1995) e através de uma forte mitogénese *in vitro* que se traduz numa rápida proliferação destas células nas primeiras 48 horas de exposição ao TGF- $\beta$  (Brady e col., 1998). No entanto, ele regula negativamente a expressão das células com um fenótipo osteoblasto-like (Brady e col., 1998).

Nas células do ligamento periodontal, o TGF- $\beta$  regula a sua própria expressão de um modo depende dos seus níveis e temporalidade (Mailhot e col., 1995). Numa fase inicial, pequenas doses de TGF- $\beta$  exógeno estimulam a expressão quer do ARNm específico do TGF- $\beta$  quer do ARNm do Colagénio tipo I. Mas a exposição contínua das células do ligamento ao TGF- $\beta$  exógeno, mesmo em pequenas concentrações, traduz-se na regulação negativa da síntese de ambas as moléculas (Brady e col., 1998).

Determinando o TGF- $\beta$  as características osteoblasto-like das células do ligamento, quando este é sujeito a forças como as que atuam no movimento ortodôntico, tanto os osteoblastos como as células osteoblasto-like além de expressarem alterações fenotípicas, sintetizam TGF- $\beta$  com a consequente indução da redução da atividade da ALP. No entanto, estes tipos celulares, ao contrário das outras células do ligamento periodontal, não sintetizam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- $\alpha$  ou PGE2 (Brady e col., 1998).

### 3.6. TGF- $\beta$ e inflamação

Os recetores, ações e efeitos do TGF- $\beta$  são similares em quase todos os tipos celulares que estão envolvidos quer na resposta à agressão a um tecido quer na sua consequente reparação. A presença do TGF- $\beta$  em células ou em fragmentos de células com origem hematopoiética permite inferir que ele tem um papel importante na resposta inflamatória e na consequente reparação dos tecidos (Roberts e col., 1986). Nesta situação, o TGF- $\beta$  além de potenciar a angiogénese, potencia também a resposta dos macrófagos e dos fibroblastos em qualquer lesão tecidular (Sporn e Roberts, 1993).

De referir que a única isoforma expressa com valores elevados no endotélio humano e no tecido hematopoiético é o TGF- $\beta$ 1. Ele é um regulador autócrino do crescimento quer das células endoteliais quer das células hematopoiéticas, inibindo nomeadamente, tal como já foi mencionado, o crescimento das células endoteliais. No que diz respeito, em particular, ao sistema endotelial durante a embriogénese, a expressão diferencial das três isoformas está relacionada com as suas especificidades funcionais (Gatherer e col., 1990).

O TGF- $\beta$  é o mais potente imunossupressor fisiológico dos mamíferos, sendo, por tal, um inibidor global da função do sistema imunitário e um regulador chave da sua homeostase, cuja disfunção leva a patologias como a doença auto-imune ou a doença inflamatória intestinal. Nesta patologia, há redução da fosforilação da Smad3 e a formação dos complexos Smad3/Smad4 está alterada, pelo que a sinalização está perturbada independentemente do facto de o TGF- $\beta$  ser abundante no intestino inflamado (Monteleone e col., 2001).

Esta função regulatória do TGF- $\beta$  é demonstrada em ratos TGF- $\beta$  *null* que desenvolveram doença inflamatória multifocal com infiltração linfocitária de vários órgãos e a produção de anticorpos auto-ímmunes (Datto e col., 1999). Dado que o TGF- $\beta$  controla a homeostase das células T através da inibição direta da sua ativação e proliferação, mas também inibindo a apresentação dos antígenos pelas células apresentadoras de antígenos (Gorelik e Flavell, 2002), pode-se inferir que a expressão deste fenótipo nos ratos *null* seja basicamente devida à perda de efeitos anti-proliferativos do TGF- $\beta$  nas células B e T (Datto e col., 1999).

Na fase inicial da resposta imune, o TGF- $\beta$  estimula o processo inflamatório através do aumento de expressão das moléculas de adesão, da criação de um gradiente quimiotático e da indução de um grande número de citocinas pró-inflamatórias. Mas a expressão do TGF- $\beta$  é paradoxalmente também fundamental na regulação negativa do processo inflamatório, promovendo a produção de matriz extracelular (Aoki e col., 2005).

Verifica-se que os grânulos  $\alpha$  das plaquetas são uma fonte importante de TGF- $\beta$  e quando este é secretado por desgranulação, o espectro dos seus efeitos é amplo. Já os macrófagos além de responderem ao sinal quimiotático do TGF- $\beta$  também são estimulados a secretar várias outras citocinas quando expostos a ele (Sporn e Roberts, 1993). Efetivamente, tanto os macrófagos como os linfócitos produzem fatores de crescimento, como o TGF- $\beta$ , que estimulam a proliferação de fibroblastos e a síntese de Colagénio. Os linfócitos ativados além de produzirem ARNm para o TGF- $\beta$ , também o secretam (Kehrl e col., 1986). No entanto, a síntese de TGF- $\beta$  pelos linfócitos coexiste com a síntese de outras linfocinas como a Linfotóxina, com fatores inibidores da clonagem ou fatores inibidores da proliferação que têm como objetivo a redução quer do número de células quer da atividade fibroblástica (Johnson e Ziff, 1976).

Assim, nos processos inflamatórios, o TGF- $\beta$  além de ser secretado por desgranulação das plaquetas é também secretado por outros tipos de células envolvidas no processo de reparação como os queratinócitos, monócitos e fibroblastos. Os queratinócitos são responsáveis pela reconstrução da barreira subcutânea; os monócitos, que infiltram a lesão numa fase precoce da cascata de inflamação, secretam uma ampla variedade de citocinas reguladoras entre as quais está o TGF- $\beta$ ; e os fibroblastos são responsáveis pela síntese de quase todos os componentes da matriz extracelular como Colagénio, proteoglicanos, Fibronectina, Tenascina bem como os recetores moleculares integrinas; e pelo bloqueio da destruição destes componentes por aumento da expressão de proteases inibidoras e diminuição da expressão de proteases degradadoras de matriz extracelular como a Estromalina, a Colagenase e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sporn e Roberts, 1993; Chung e col., 2007).

A secreção de TGF- $\beta$  pelas plaquetas, linfócitos e pelo sistema monocítico-macrofágico em locais de lesão tecidual associada ou não a uma resposta imune parece ter influência na estimulação da migração de fibroblastos dos tecidos conjuntivos adjacentes, estimulando também os fibroblastos a sintetizarem quantidades adicionais de componentes da matriz extracelular (Postlethwaite e col., 1987).

O bloqueio da sinalização do TGF- $\beta$  por deleção específica do recetor T $\beta$  RII nas células T leva a alterações quer no desenvolvimento das células T quer na sua homeostase, traduzindo-se numa inflamação auto-imune e eventualmente em morte (Li e col., 2006b). Igualmente, o TGF- $\beta$  regula a diferenciação e ativação de outros tipos de leucócitos como células B, células NK, células dendríticas, granulócitos e mastócitos (Li e col., 2006a).

O TGF- $\beta$  regula diversas funções dos fibroblastos como quimiotaxia ou a síntese de Colagénio e de Fibronectina, cuja expressão de ARNm é estimulada pela presença do TGF- $\beta$ . Esta resposta é dependente da dose e dependente do tipo de célula, sabendo-se, nomeadamente que os fibroblastos da gengiva apresentam respostas diferentes dos fibroblastos do ligamento periodontal (Mailhot e col., 1995). No entanto, também este facto tem implicações na embriogénese, onde o TGF- $\beta$  tem um papel importante na sinalização da migração dos fibroblastos que sintetizam o *scaffolding* da matriz necessário à organogénese (Postlethwaite e col., 1987).

Apesar do TGF- $\beta$  ser um regulador da atividade dos fibroblastos, induzindo a neoformação de tecido conjuntivo e Colagénio, ele também bloqueia a destruição da matriz extracelular recém-sintetizada através de dois mecanismos distintos: (1) regulando positivamente a síntese dos inibidores das proteases como o PAI-1 e o inibidor tecidual das metaloproteinases e; (2) regulando negativamente a síntese das proteases propriamente ditas como a Estromalina, a Colagenase e a Hidrogénio peroxidase (Sporn e Roberts, 1993; Yan e col., 2009). Estes efeitos conjuntamente com a indução de uma intensa resposta angiogénica permite especular sobre o seu importante papel como mediador na reparação tecidual.

Devido a este facto, o TGF- $\beta$  tem um papel importante no desenvolvimento de fibrose em diferentes tecidos como a pele, fígado, rim, olho, pulmão e em células sistema cardiovascular. Como ele induz a transcrição de fibrilas de Colagénio dependente da Smad3 e inibe a degradação da matriz extracelular, esta logicamente acumula (Yan e col., 2009).

Experimentação em rato demonstrou que animais Smad3 *null* apresentavam inibição quer da proliferação dos fibroblastos quer da resposta genética mediada pelo TGF- $\beta$  (Datto e col., 1999), uma aceleração do processo de cicatrização em comparação com os *wild-type* da mesma ninhada, bem como uma resposta inflamatória limitada (Ashcroft e col., 1999). Este facto é consequência do aumento da reepitelização pelos queratinócitos em proliferação, da diminuição da infiltração da lesão e da diminuição da produção de TGF- $\beta$  pelos monócitos, o que se traduz subsequentemente numa diminuição da resposta fibrótica (Ashcroft e col., 1999; Chung e col., 2007). Contrariamente, a expressão da Smad3 *in vivo* determina a inibição da reepitelização com os consequentes efeitos na diminuição da proliferação dos queratinócitos e na quimiotaxia dos monócitos e neutrófilos mediada pelo TGF- $\beta$  (Chung e col., 2007). Apesar do TGF- $\beta$  ser um potente quimioatratante para os macrófagos, este facto sugere que as respostas inflamatórias não são primordiais para a reepitelização, mas fornecem os meios de combate a uma possível infeção e servem de reservatório local de TGF- $\beta$  necessário à deposição de matriz e à reparação tecidual elaborada pelos fibroblastos (Chung e col., 2007).

Níveis elevados de TGF- $\beta$  e diminuição dos níveis de Smad7 são encontrados em tecidos nos quais ocorre uma resposta fibrótica incontrolada (Yan e col., 2009). Deste modo, em estudos experimentais em rato, a inibição da expressão da Smad3 por sobreexpressão de Smad7 demonstrou ser o melhor método para controlar e minimizar este fenómeno no fígado, pulmão e rim, permitindo inferir o importante papel anti-fibrótico da Smad7 na sinalização da Smad3 (Flanders, 2004)

Alterações da expressão da Smad7 foram associadas com diversas doenças como fibrose, doenças inflamatórias e a carcinogénese. Demonstrou-se que a sobreexpressão da Smad7 além de ter uma ação anti-fibrótica tem também um papel inibidor na carcinogénese e na inflamação. Na realidade, a Smad7 é de todas as Smads a que tem maiores efeitos, por exemplo, no desenvolvimento da pele. Ela encontra-se expressa em níveis muito baixos em queratinócitos normais (He e col., 2001) e está frequentemente sobreexpressa em condições patológicas como no caso dos indivíduos idosos, em indivíduos com a pele precocemente envelhecida pela exposição solar (He e col., 2002) e na carcinogénese dérmica (He e col., 2001).

### 3.7. TGF- $\beta$ e clínica

A manutenção da homeostase dos tecidos quer durante o desenvolvimento embrionário quer durante o crescimento subsequente resulta de um cuidadoso e complexo equilíbrio das vias de transdução de sinal, sendo a maior parte das doenças humanas produto da inadequada ativação ou inibição destas vias. O facto da superfamília do TGF- $\beta$  ser um dos reguladores que está ubiquamente presente nos mecanismos de desenvolvimento embrionário e nos processos fisiológicos e celulares (Gordon e Blobel, 2008), transformou-a num alvo terapêutico importante em diversas doenças.

Mutações quer do TGF- $\beta$  quer de elementos das suas vias de sinalização são também fenómenos frequentemente associados a diversas patologias (Gordon e Blobel, 2008). Estas mutações e o facto do TGF- $\beta$  e dos seus antagonistas serem reguladores multifuncionais da proliferação e da diferenciação celular, modelando a síntese de proteínas da matriz extracelular ou suprimindo o sistema imunitário, compromete-o em diversas patologias como feridas com processos de cicatrização alterados, fraturas, lesões de isquémia-reperfusão ou doenças auto-imunes (Flanders e Burmester, 2003).

A capacidade que o TGF- $\beta$  apresenta de promover a cicatrização de lesões tanto em tecidos moles como em tecidos duros, bem como os seus efeitos imunossupressores estão na base da sua utilização terapêutica. Verificou-se que a aplicação tópica de TGF- $\beta$  beneficia e acelera a cicatrização de feridas cutâneas em modelos experimentais animais nos quais se provocou alteração dos processos de cicatrização com corticosteróides, agentes antineoplásicos, radiação, diabetes ou mesmo no envelhecimento (Beck e col., 1993; Flanders e Burmester, 2003).

Os corticosteróides, nomeadamente, atrasam o processo inflamatório e a cicatrização através da diminuição da quimiotaxia das células inflamatórias, pela inibição da angiogénese, pela diminuição da proliferação de fibroblastos e da síntese de matriz extracelular (Wahl, 1989). Já o TGF- $\beta$  promove a neovascularização, a quimiotaxia dos macrófagos, a proliferação dos fibroblastos, bem como a síntese e maturação da matriz extracelular, sendo capaz de reverter muitos dos efeitos quer dos corticosteróides quer do envelhecimento (Beck e col., 1993). Também foi determinado que a aplicação tópica de TGF- $\beta$  no tratamento de lesões maculares é positiva, sendo um tratamento prático e eficaz (Glaser e col., 1992).

A investigação realizada sobre o TGF- $\beta$ , as suas vias de transdução de sinal e os seus antagonistas em associação ou não a patologias nas quais ele é um interveniente primordial permitiu estender, deste modo, à prática clínica e ao tratamento rotineiro de muitas situações comuns debilitantes que não respondem bem aos tratamentos convencionais, a utilização de fatores de crescimento como o TGF- $\beta$  (Flanders e Burmester, 2003).

Na realidade, devido ao interesse crescente na medicina preventiva bem como na relação qualidade-custo dos tratamentos, a atuação terapêutica sobre a grande variedade de mecanismos nos quais o TGF- $\beta$  tem um papel fundamental, permite a prevenção de lesões teciduais bem como a aceleração da sua reparação (Sporn e Roberts, 1993). Atualmente, encontram-se já em comercialização produtos anti-envelhecimento e produtos promotores de cicatrização nos quais o TGF- $\beta$  é um dos componentes fundamentais (Gorouhi e Maibach, 2009).

Como o TGF- $\beta$  estimula a transcrição de fibrilas de Colagénio e inibe a degradação da matriz extracelular, o que conduz à sua acumulação (Yan e col., 2009), nas patologias que decorrem com a formação de quelóides, na glomerulonefrite ou na fibrose pulmonar, a excessiva expressão de TGF- $\beta$  é responsável pela acumulação de tecido cicatricial nocivo. Isto implica que a eventual utilização de agentes que inibam ou bloqueiem a ação do TGF- $\beta$  se traduza na reversão ou na prevenção da doença em causa (Flanders e Burmester, 2003).

Muitas das condições clínicas que decorrem com fibrose como o linfedema, que se desenvolve como resultado quer da excisão dos nódulos linfáticos nas mastectomias quer da subsequente radioterapia, estão associadas a um aumento da expressão do TGF- $\beta$  (Martin e col., 2000). A inibição do TGF- $\beta$  ou das suas moléculas efetoras como a Smad3 diminui o tecido cicatricial fibroso produzido pela radiação e melhora a cicatrização da lesão (Gauldie e col., 2006).

Um fator comum a muitas doenças renais progressivas é a alteração fibrótica do compartimento tubulointerstitial, na qual há acumulação estrutural de proteínas da matriz acompanhada pela infiltração de macrófagos e do aumento do número de fibroblastos no interstício (Eddy, 1996). Sendo os fibroblastos intersticiais a principal fonte de TGF- $\beta$ , a utilização de oligodeoxinucleotídeos anti-senso para o TGF- $\beta$  nas células intersticiais demonstrou ser eficaz na supressão da regulação positiva do TGF- $\beta$ , levando ao bloqueio da fibrose intersticial (Isaka e col., 2000).

No que diz respeito à investigação relacionada com a intervenção terapêutica nos processos carcinogénicos, esta é longa e complexa, abrangendo vários tipos de tumores. O TGF- $\beta$  tem um papel fundamental na carcinogénese, suprimindo o crescimento tumoral numa fase inicial da neoplasia, mas promovendo a progressão do tumor e a sua metastização nas fases mais tardias (Prud'homme, 2007), altura em que as células tumorais se tornam resistentes aos efeitos inibidores do crescimento desta citocina. É por este motivo

que os tumores malignos expressam grandes quantidades de TGF- $\beta$  que deprimem as respostas imunes anti-carcinogênicas ao nível das células T *helper*, linfócitos T citotóxicos, células dendríticas, macrófagos, células NK e células B, ao mesmo tempo que estimulam as células T reguladoras. Estes efeitos em conjunto tornam as vacinas anti-carcinogênicas pouco eficazes e são um obstáculo colossal na imunoterapia (Prud'homme, 2007).

No entanto, existem estudos clínicos efetuados em doentes com glioblastomas sobre a eficácia de vacinas de células tumorais modificadas com ADN anti-senso para o TGF- $\beta$ 2, cujo objetivo é imunossuprimir a expressão do TGF- $\beta$  nas células dos tumores, potenciando o reconhecimento destas pelo sistema imune (Fakhrai e col., 2006).

Experimentação em rato demonstrou a eficácia da utilização de antagonistas do TGF- $\beta$  na inibição quer do crescimento tumoral quer metastático. Também aqui, a utilização de oligonucleotídeos anti-senso para o TGF- $\beta$ 2 inibe o crescimento de melanomas (Fakhrai e col., 1996) e de fibrossarcomas (Spearman e col., 1994).

Dado que o TGF- $\beta$  é um potente imunossupressor, a sua administração inibe o crescimento e a metastização de carcinomas orais em ratos sem promover a alteração da morfologia ou diferenciação celular (Davies e col., 2000).

Na cavidade oral, o TGF- $\beta$  é um mediador fundamental na cicatrização de lesões (Yang e col., 1996). Aqui, o TGF- $\beta$  com origem principalmente em macrófagos ativados, mas também em eosinófilos (Tyler e col., 1999), linfócitos, fibroblastos, osteoblastos e osteoclastos (Bodine e col., 1995), acelera o processo de cicatrização tanto dos tecidos duros como dos moles, participando na reparação dos tecidos periapicais lesados (Tyler e col., 1999). No entanto, a eficácia da utilização de TGF- $\beta$ , particularmente de rhTGF- $\beta$  (TGF- $\beta$  recombinante humano), na regeneração de lesões periodontais em humanos ou em modelos experimentais em cão não tem sido solidamente confirmada (Wikesjö e col., 1998; Tatakis e col., 2000).

Nas hiperplasias gengivais de origem medicamentosa, nas quais além dos fibroblastos gengivais proliferarem como resposta ao TGF- $\beta$  (James e col., 1998; Pakosz e col., 2012), ocorrer também um desequilíbrio entre a síntese e a degradação de matriz extracelular (Subramani e col., 2013), o ligando TGF- $\beta$  não é o alvo direto da terapia anti-fibrótica. O recurso à utilização de inibidores do T $\beta$  RI parece ser a estratégia mais eficaz, uma vez que o bloqueio deste recetor reduz os efeitos pró-fibróticos do TGF- $\beta$  nos fibroblastos gengivais que persistem estimulados pelo medicamento (Thompson e col., 2010; Subramani e col., 2013).

A atividade do TGF- $\beta$  como citocina anti-inflamatória associada à sua capacidade de estimular a síntese de proteínas da matriz extracelular permite-lhe limitar de algum modo a destruição tecidual que ocorre nos doentes com periodontite. Ele suprime os efeitos das citocinas pró-inflamatórias ao mesmo tempo que medeia a reparação e reconstrução do ligamento periodontal (Terranova e Wikesjö, 1987), sendo, por isso, um biomarcador importante do processo regenerativo destes doentes (Sattari e col., 2011).

#### 4. Objetivos

A literatura atualmente disponível é relativamente omissa no que concerne ao estudo das vias de sinalização do TGF- $\beta$  no movimento dentário ortodôntico, sendo por tal desconhecido se nas alterações que o periodonto sofre sob a ação de forças, esta citocina multifuncional se expressa nomeadamente através da via de sinalização canónica das Smads.

Uma vez que o movimento dentário ortodôntico se apoia na presença de um mecanismo inflamatório sistematicamente reativado pelo ortodontista nas consultas de controlo, a possibilidade de ocorrer uma desregulação incontrolada quer do processo inflamatório quer da atividade de qualquer uma das moléculas intervinientes, com consequências graves para os tecidos periodontais, é uma constante.

No ligamento periodontal sujeito a forças ortodônticas, os fibroblastos são células essenciais à regeneração, adaptação e remodelação quer deste tecido conjuntivo quer do osso alveolar adjacente, dado que a sua grande plasticidade e versatilidade lhes permite diferenciar em outros tipos celulares como células do tecido ósseo.

Em virtude da relevância do TGF- $\beta$  como regulador da atividade dos fibroblastos na formação de tecido conjuntivo e Colagénio, bem como da atividade das células do tecido ósseo, é objetivo deste trabalho determinar o papel desta citocina e os mediadores da sua sinalização no mecanismo de reparação dos tecidos periodontais lesados pela aplicação de forças, dada a possibilidade de poderem ser utilizados como biomarcadores terapêuticos da reposição das populações celulares essenciais à regeneração destes tecidos durante os processos inflamatórios associados ao movimento dentário ortodôntico. Tendo em mente a persecução deste objetivo avaliou-se a persistência da ativação/inativação da via de sinalização do TGF- $\beta$ /R-Smads, Smad2 e Smad3, no ligamento periodontal sujeito à ação de forças, a fim de determinar o envolvimento da via canónica do TGF- $\beta$  nos processos de remodelação, adaptação e reparação do periodonto durante o movimento ortodôntico, perspetivando-se o seu uso como alvo terapêutico em processos biológicos que decorrem com alterações dos tecidos periodontais.



## **Capítulo II. Estudo Experimental em Modelo Animal**



## **I. Material e Métodos**

### **I.1. Animais e Grupos Experimentais**

O estudo foi efetuado em rato não consaguíneo da estirpe *Wistar* (*Rattus Norvegicus albinus*), do sexo masculino e jovem no início da experiência. Este rato é considerado bom para a execução de modelos experimentais em patologia oral. Esta espécie e estirpe é frequentemente usada em Medicina Dentária experimental, permitindo que os resultados obtidos sejam, de um modo geral, transpostos para a espécie humana.

O ensaio experimental foi realizado de acordo com as normas da Direção-Geral de Alimentação e Veterinária, tendo a autorização n.º 0421/000/000/2014.

Os animais utilizados foram adquiridos à Charles River Laboratories (Charles River Laboratories Inc., Research Models and Services, Barcelona) com 10 semanas de idade. Foram mantidos em quarentena durante uma semana, seguida de uma semana de repouso, iniciando-se a sua manipulação às 12 semanas.

Os ratos *Wistar* foram mantidos em condições de manutenção de acordo com a legislação em vigor e aplicada no Biotério instalado na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra no pólo I. A legislação atual está disposta no Decreto-Lei n.º 113/2013 de 7 de Agosto do Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território que transpôs para a ordem jurídica interna a Diretiva n.º 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de setembro de 2010, revogando o Decreto-Lei n.º 129/92 de 6 de julho, alterado pelo Decreto-Lei n.º 197/96 de 16 de outubro, bem como a Portaria n.º 1005/92 de 23 de outubro, alterada pelas Portarias n.ºs 466/95 de 17 de maio e 1131/97 de 7 de novembro.

Os ratos foram escolhidos aleatoriamente, identificados e distribuídos em número de três por gaiola. Foram mantidos durante toda a experiência em sala própria com ar condicionado, com temperatura ambiente de 21°C, com ciclos de luz/escuro de 12/12 horas e humidade relativa de 55%±15%. A dieta alimentar proporcionada uma vez por dia foi o granulado padronizado para roedores de laboratório (SAFE, Scientific Animal Food e Engineering) e a água proporcionada teve origem na rede de abastecimento municipal, ambas providenciadas *ad libitum*. Foram aclimatados durante duas semanas antes de se iniciar o protocolo experimental. O controlo diário das condições de salubridade da sala de tratamento e dos animais foi realizado por técnicos especializados do Biotério.

Foram utilizados 70 animais divididos por 5 grupos experimentais correspondendo a: (1) Grupo C01, grupo de controlo onde não foi induzido movimento ortodôntico, com 10 animais; (2) Grupo T01, no qual o movimento ortodôntico foi realizado durante 24 horas, com 15 animais (3) Grupo T02, no qual o movimento ortodôntico foi realizado durante 48 horas, com 15 animais (4) Grupo T03, no qual o movimento ortodôntico foi induzido durante 72 horas, com 15 animais (5) e Grupo T04, no qual o movimento ortodôntico foi induzido durante 96 horas, com 15 animais (Tabela II.1).

Tabela II.1 – Esquemática do protocolo experimental

Grupo	Designação dos grupos	Procedimento	Tempo	nº de animais
C01	Controlo	Sem manipulação		10
T01	Teste	Elastómero no 1º e 2º Q	24 horas	15
T02		Elastómero no 1º e 2º Q	48 horas	15
T03		Elastómero no 1º e 2º Q	72 horas	15
T04		Elastómero no 1º e 2º Q	96 horas	15

Nota: Q - quadrante.

As diferentes fases do protocolo experimental deste estudo, desde a chegada dos animais ao biotério até ao seu sacrifício estão esquematizadas no cronograma (Figura 2.1).

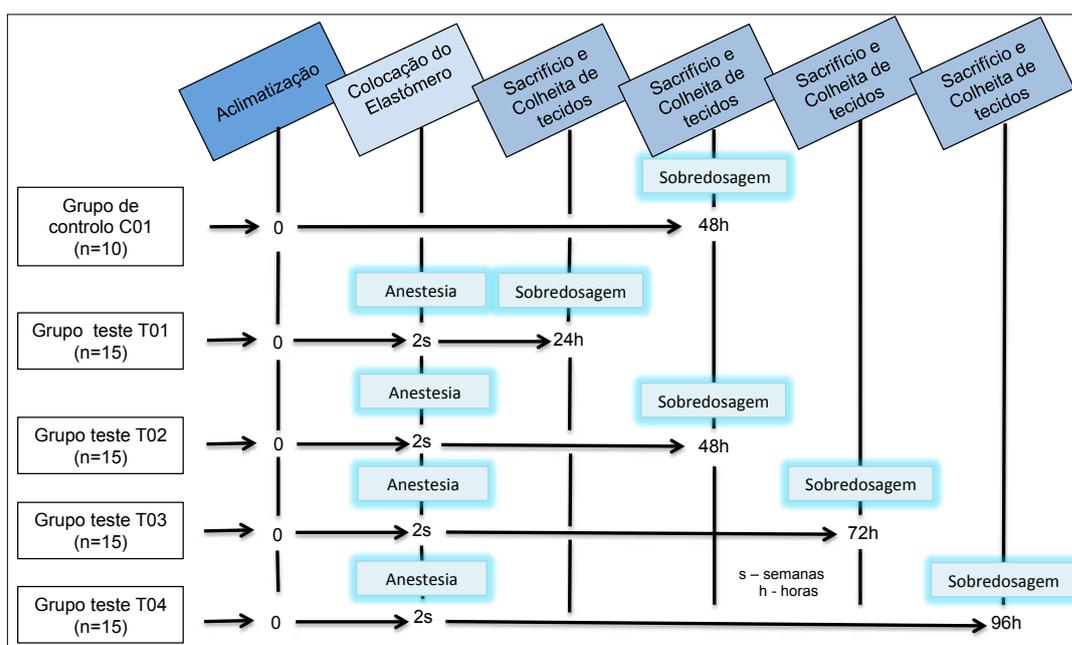


Figura 2.1 – Cronograma do estudo experimental em rato Wistar.

## 1.2. Movimento dentário experimental

O movimento dentário ortodôntico experimental foi induzido com os animais posicionados numa mesa operatória, em decúbito dorsal com a cabeça e membros imobilizados e a mandíbula em hiperextensão.

Com base em protocolos já testados e publicados, o movimento dentário foi induzido de acordo com uma modificação do Método de Waldo (Waldo e Rothblatt, 1954; Zaki e Vanhuysen, 1963; Tanabe e col., 2010). Elastómeros com 0,8 mm de espessura (ref.<sup>a</sup> 774-549-00, Dentaurum, Springer, Germany), escolhidos aleatoriamente, foram inseridos entre o primeiro e o segundo molares maxilares, quer no primeiro quer no segundo quadrante (Figura 2.2).

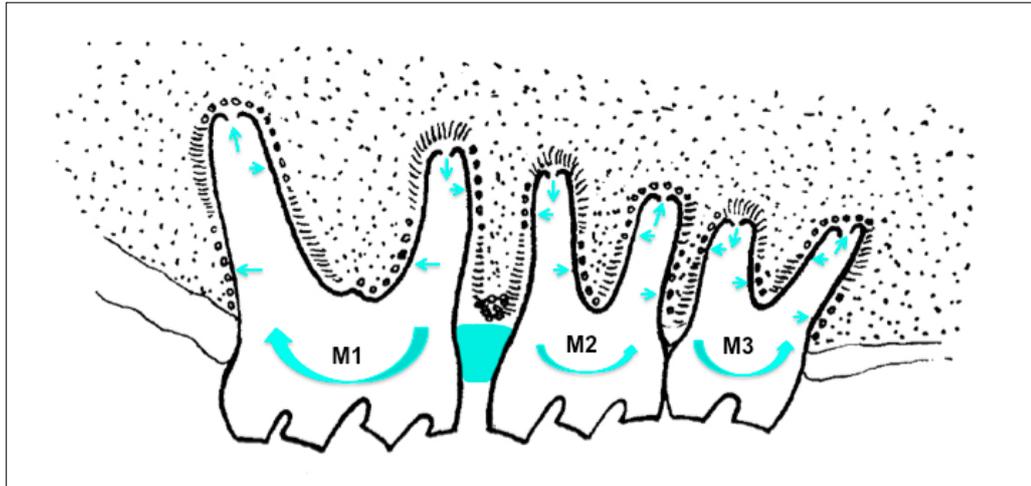


Figura 2.2 – Desenho ilustrando a distribuição da força atuante sobre o 1º (M1), 2º (M2) e 3º molar (M3) maxilares após a colocação do elastômero. Adaptado de Waldo e Rothblatt, 1954.

No rato *Wistar*, os dentes maxilares (Figura 2.3) têm uma área de contacto maior do que os dentes mandibulares, sendo também mais acessíveis principalmente quando o animal está em decúbito dorsal.

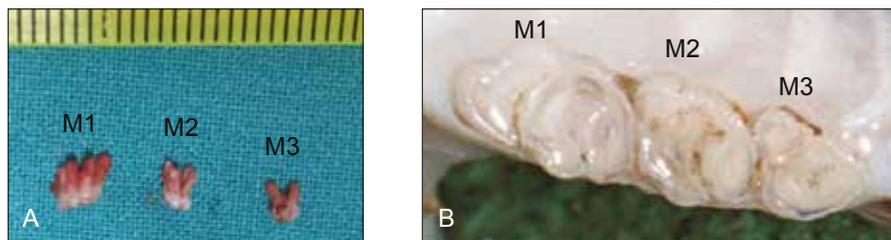


Figura 2.3 – (A) Os três molares maxilares (M1, M2 e M3), sendo visível as suas diferentes dimensões, bem como a disposição radicular. (B) Face oclusal dos dentes do 1º quadrante, mostrando as dimensões coronárias relativas e as respetivas superfícies de contato.

Cada elastômero, cuja espessura foi previamente confirmada com um paquímetro digital electrónico (Powerfix.Profi®, model No. Z22855, version 07/2008), foi colocado no espaço interproximal com duas pinças mosquito curvas (Ref.ª 800-8014, AEZ®/ETM®, Orange, CA, USA). Depois de colocado e estabilizado na posição correta, o elastômero foi cortado por palatino e por vestibular com uma tesoura cirúrgica (Ref.ª 855A/18, Carl Martin, Solingen, Germany). Apesar da cavidade oral e os espaços interdentários destes animais serem de dimensões reduzidas, o elastômero foi colocado no espaço interproximal, de modo a abranger a superfície de contacto entre os dois molares e evitando tocar a papila interproximal.

Durante este procedimento experimental foi necessário induzir uma anestesia geral profunda, algo que é requerido para permitir uma boa prática médica e por razões éticas e legais. A imobilização do animal permite que a sua manipulação seja executada com o menor desconforto possível, sendo também mais rápida e eficaz.

Antes de iniciar a indução do movimento dentário todos os animais foram anestesiados por via intramuscular com 100mg/kg de um anestésico geral dissociativo injetável, não barbitúrico e de ação rápida, o cloridrato de ketamina (Ketalar®, Parke-Davis Co., Barcelona, Spain) em associação com 14mg/kg de um hipnótico não narcótico, tranquilizante adrenérgico com propriedades de relaxamento muscular, a xilazina (Rompun, Bayer Co., Amadora, Portugal). Esta associação permitiu uma anestesia profunda por um período médio de 40 minutos, suficiente para a colocação do elastômero indutor de força.

Após a execução deste protocolo, os ratos *Wistar* foram controlados até à recuperação total da anestesia. Cada animal foi colocado separadamente numa gaiola sem forragem, para não haver risco de aspiração, não lhe tendo sido fornecida água ou comida até que estivesse completamente desperto. A gaiola foi mantida parcialmente isolada da luz ambiente e, dado que a hipotermia é uma das causas mais corrente de morte após anestesia, o animal foi mantido aquecido. Como a manipulação foi pouco invasiva, optou-se por não administrar algum analgésico ou anti-inflamatório.

Os animais foram sacrificados individualmente com uma sobredosagem de cloridrato de ketamina (Ketalar®, Parke-Davis Co., Barcelona, Spain) administrada por via intramuscular. Após a confirmação do óbito, foi efetuada a necrópsia.

### 1.3. Estudo Necrópsico Macroscópico

A todos os animais foi feita a necrópsia obedecendo à normas do Instituto de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Após o sacrifício foi feita a observação do hábito externo, fotografias, pesagem e medições necessárias para se calcular o índice de Lee. De seguida, efetuou-se a observação do hábito interno, a colheita de dados macroscópicos e envio de fragmentos para estudo histológico de todas as topografias com alterações morfológicas ou que fossem alvos privilegiados do estudo. Foram sempre colhidos fragmentos de fígado, rim e pulmão para estudo morfológico de rotina. Como coloração de rotina foi sempre utilizada a Hematoxilina-Eosina (HE).

Para o estudo dos dentes foi colhido o maxilar. De modo a otimizar a recolha das amostras, fez-se a luxação das articulações temporomandibulares e após incisão jugal bilateral méso-palatina removeu-se a mandíbula. Com acesso direto removeu-se o maxilar, o qual, após se retirar a pré-maxila, foi posteriormente seccionado longitudinalmente em dois hemi-maxilares (Figura 2.4).



Figura 2.4 – Fragmento hemi-maxilar direito antes da inclusão, sendo visíveis os três molares e parte do palato.

Cada amostra foi imediatamente colocada no fixador (formol neutro tamponado a 10%), em recipientes próprios corretamente identificados quanto ao grupo experimental, quanto ao número de registo do animal no Instituto de Patologia Experimental e quanto ao hemi-maxilar em causa (topografia). Para evitar enganos foram utilizadas cores diferentes, permitindo distinguir melhor o lado direito (branco) do lado esquerdo (vermelho).

No final da necrópsia, os cadáveres e os restantes resíduos morfológicos foram eliminados de acordo com a legislação em vigor.

#### 1.4. Estudo Micro-morfológico

Os fragmentos colhidos foram mantidos no fixador formaldeído neutro tamponado a 10% até se iniciar o processamento ou se iniciar a descalcificação que antecedeu o processamento.

Para a descalcificação, os fragmentos foram reduzidos quer no sentido méso-distal, sendo seccionados por distal do último molar; quer no sentido vertical, passando a incluir somente a totalidade dos dentes, o correspondente espaço periodontal e uma porção do osso alveolar adjacente, assegurando-se que não houve dano do ligamente periodontal. Seguidamente foram lavados em água destilada e descalcificados em ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) a 10%, à temperatura ambiente, durante cerca de 2 semanas.

Após o processamento, as amostras foram incluídas em blocos de parafina e orientadas de modo a se obterem cortes seriados, vestibulo-palatinos, de 6µm de espessura (Figura 2.5). Após o corte, cada plano obtido foi observado para avaliação da morfologia (Figura 2.6) e feita uma coloração de HE (Figura 2.7), sendo também selecionados cortes para Imunohistoquímica (IHC, *immunohistochemistry*).

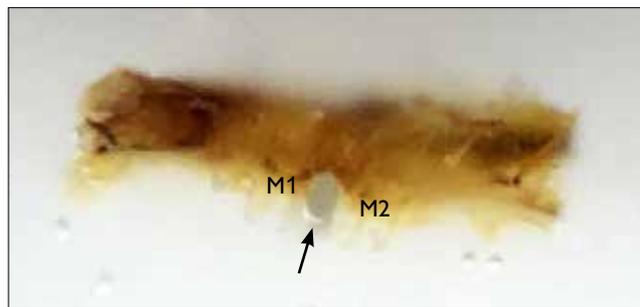


Figura 2.5 – Tecido descalcificado, incluído em parafina, mostrando os dentes (M1 e M2) e o elástico (seta).



Figura 2.6 – Lâmina histológica não corada, mostrando o local que tinha sido ocupado pelo elástico (seta) e pelos 1º e 2º molares (M1 e M2).

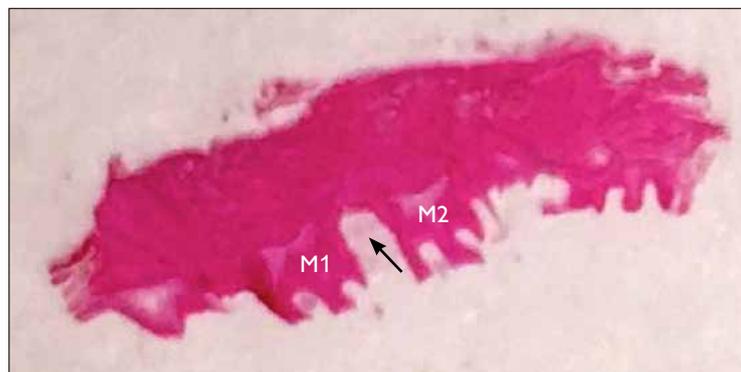


Figura 2.7 – Lâmina histológica corada com HE, mostrando o local que tinha sido ocupado pelo elástico (seta) e o 1º e 2º molares maxilares.

Feita a seleção das áreas a processar, a expressão do TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad3, IL-10, Actina do músculo liso alfa ( $\alpha$ -Sma, *Alpha-smooth muscle Actin*) e Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, *proliferating cell nuclear antigen*) foi avaliada por IHC após marcação das secções com anticorpos específicos. Após otimização dos anticorpos, a imunomarcação foi realizada através do método estreptavidina-biotina/*horseradish peroxidase* (LSAB, *labeled streptavidin biotin method*).

O método LSBA exige a desparafinação das secções em xilol, seguida pela sua rehidratação numa máquina processadora usando concentrações decrescentes de etanol (100°, 95°), água e água destilada. As secções são seguidamente sujeitas a um pré-tratamento para recuperação do antígeno através da ação do calor, de modo a eliminar qualquer alteração que este tenha sofrido devido ao fixador, permitindo a recuperação dos seus epitopos. De acordo com a especificidade de cada anticorpo primário, as lâminas foram mergulhadas na solução tampão EDTA pH 8 ou citrato pH 6 e aquecidas num microondas com potência de 760 watts durante 10 minutos (Tabela II. 2). Seguidamente as amostras foram arrefecidas em banho-maria e lavadas com a solução tampão fosfato-salino (PBS, *phosphate buffered saline*).

Tabela II.2 – Resumo do protocolo correspondente a cada anticorpo

	Clone	Diluição	Recuperação antigénica (min.)	Incubação do anticorpo primário (min.)	Controlo externo
TGF- $\beta$ 1	monoclonal	16 $\mu$ g/ml	EDTA (20')	durante a noite a 4° C	carcinoma da próstata
Smad2	monoclonal	1/50	EDTA (20')	30' a temperatura ambiente	carcinoma da mama
Smad3	policlonal	1/80	citrato (20')	30' a temperatura ambiente	carcinoma da mama
IL-10	policlonal	5 $\mu$ g/ml	EDTA (20')	durante a noite a 4°C	baço de murganho
$\alpha$ -Sma	monoclonal	1/300	citrato (20')	durante a noite a 4°C	músculo
PCNA	monoclonal	1/200	citrato (20')	durante a noite a 4°C	intestino delgado

As fases seguintes foram realizadas à temperatura ambiente e as lavagens entre os diferentes passos feitas com PBS. A IHC exige o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogénio a 3% durante 15 minutos, uma vez que aquela bloqueia inespecificamente o anticorpo utilizado. De seguida, efetuou-se o bloqueio do soro com soro normal de cabra (TA-125-PBQ, UltraVision Protein Blk, Labvision) durante 10 minutos. As secções foram incubadas com o respetivo anticorpo primário (Tabela II.3.) de acordo com as instruções do fabricante e após a sua optimização (Tabela II.2.). Seguidamente foram incubadas com o anticorpo secundário biotinilado (cabra anti-polivalente) durante 15 minutos e posteriormente com o complexo proteico de estreptavidina e peroxidase também durante 15 minutos (TA-015-BB, Thermofisher Scientific, Fremont, USA). As secções foram de seguida incubadas durante 10 minutos com cromogénio diaminobenzidina (DAB), que ao reagir com a peroxidase produz um precipitado castanho visível na zona do antígeno, sendo posteriormente o contraste nuclear realizado com hematoxilina em máquina própria. Finalmente as secções foram novamente desidratadas numa sequência de água e alcoóis em concentrações crescentes (95°, 100°) para poderem ser observadas em microscopia de luz.

Tabela II.3 – Anticorpos utilizados no estudo

anticorpo anti-TGF- $\beta$ 1	MAB240, ReD systems, Minneapolis, USA
anticorpo anti-Smad2 [EP567Y]	ab63576, Abcam, Cambridge, UK
anticorpo anti-Smad3 (fosfo S425) [EP823Y]	ab51177, Abcam, Cambridge, UK
anticorpo anti-IL-10	AF-217-NA, ReD systems, Minneapolis, USA
anticorpo anti- $\alpha$ -Sma	HHF35, Dako, Glostrup, Denmark
anticorpo anti-PCNA	PC10, Waltham, Massachusetts, USA

## **2. Resultados**

A observação das imagens histológicas demonstrou que a metodologia utilizada no processamento das amostras foi apropriada para observação em microscopia de luz, permitindo a obtenção de secções de boa qualidade e de material bem preservado.

No entanto, a presença na mesma amostra de tecidos moles e tecidos duros, estes últimos necessitando de ser descalcificados, originou alguns artefactos técnicos no momento de processamento do material, surgindo áreas de retração tecidual característica em algumas das secções observadas, havendo destacamento entre o cimento e o ligamento periodontal. Contudo, na maior parte dos casos houve uma perfeita correspondência entre as interfaces dos dois tecidos.

Na análise por IHC subsistiram as mesmas limitações observadas nas secções para estudo morfológico que foram, no entanto, agravadas pelo método utilizado na recuperação do antigénio.

### **2.1. Observação macroscópica**

Durante a fase experimental, os animais não apresentaram qualquer alteração dos seus hábitos nem nenhum tipo de comportamento indicador de patologia, pelo que nenhum deles, por este motivo, foi excluído do estudo. No conto geral, não houve alterações significativas de peso inicial, durante os curtos períodos experimentais em que a força aplicada este ativa.

O valor do índice de Lee para todos os animais foi normal. De acordo com o observado não se encontraram alterações morfológicas significativas, nem ponderais relativas dos órgãos internos, pelo que se concluiu que todos os animais eram normais, não apresentando qualquer lesão que pudesse interferir com o estudo efectuado.

No entanto, devido à impossibilidade de realizar o sacrifício e subsequente necrópsia nos tempos experimentais apropriados, quatro animais do grupo T01, cinco animais do grupo T02, um animal do grupo T03 e três animais do grupo T04 não foram considerados, tendo sido eliminados do estudo (Tabela II.4).

A observação macroscópica das amostras revelou que no grupo T01, dois animais tinham perdido o elastómero do segundo quadrante e um tinha perdido o do primeiro quadrante. No grupo T02, dois animais perderam o elastómero do segundo quadrante e dois perderam o do primeiro quadrante. No grupo T03, um rato não tinha o elastómero do segundo quadrante e quatro não tinham o do primeiro quadrante. No último grupo T04, quatro animais perderam o elastómero do segundo quadrante (Tabela II.4).

Tabela II.4 – Resumo do número de animais eliminados do estudo e do número de elastômeros que não mantiveram a sua posição

Grupo	Removidos do estudo	Sem elastômero	
		2° quadrante	1° quadrante
Grupo T01	4	2	1
Grupo T02	5	2	2
Grupo T03	1	1	4
Grupo T04	3	4	-
Total	13	9	7

## 2.2. Histopatologia

Nas secções coradas com HE e marcadas pelos anticorpos foram analisados os tecidos periodontais associados ao primeiro molar maxilar, em particular o ligamento periodontal, o osso alveolar e o cimento radicular.

Para melhor compreensão dos eventos observados, a sequência de apresentação dos resultados inicia-se pelo grupo C01 de controlo, seguido pelo grupo teste T01 de 24 horas, depois pelo grupo teste T02 de 48 horas, depois pelo grupo T03 de 72 horas e finalmente o grupo teste T04 de 96 horas.

### 2.2.1 Grupo C01 – Controlo, sem manipulação

O ligamento periodontal surgiu com o aspeto característico de tecido mesenquimatoso, sendo visível um grande número de células fusiformes distribuídas uniformemente ao longo de todo o ligamento (Figura 2.8).



Figura 2.8 – Aspeto histológico do ligamento periodontal, no qual é visível um grande número de células fusiformes distribuídas uniformemente. H.E., x400 no original.

(D - dente; LP - ligamento periodontal).

O ligamento periodontal apresentou-se, de um modo geral, bastante uniforme e com uma espessura constante, não sendo possível detetar qualquer alteração relativa no lado distal relacionada com o deslizamento fisiológico neste sentido do 1º molar maxilar.

Foi ainda possível observar nitidamente feixes de fibras de Colagénio, de orientação maioritariamente oblíqua, inseridos no osso alveolar e no cimento acelular.

Os capilares da polpa dentária surgiram com um aspeto normalizado, não sendo detetados quaisquer sinais de processo inflamatório. Os odontoblastos presentes tinham um arranjo regular e organizado (Figura 2.9).

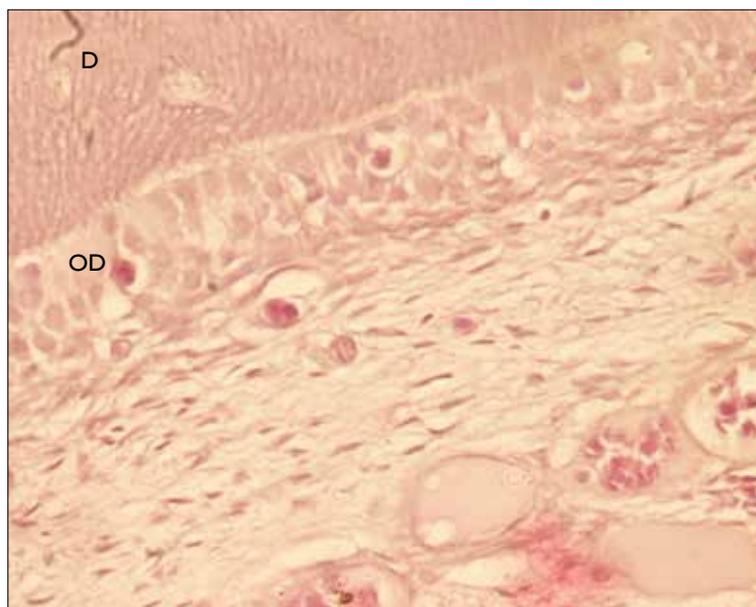


Figura 2.9 – Aspeto histológico da polpa dentária, na qual se observam os odontoblastos no seu arranjo regular e organizado, sendo também visíveis vasos sanguíneos pulpare. H.E., x400 no original.

(D - dentina; OD - odontoblastos).

A dentina radicular, nos dois terços coronários, apresentou-se coberta por uma camada pouco espessa e relativamente regular de cimento acelular; isto é, sem células no interior da sua matriz extracelular. Os cementoblastos sustentaculares eram visíveis e encontravam-se dispostos em paliçada na interface entre o ligamento periodontal e o novo cimento (Figura 2.10). Em algumas secções, a superfície do cimento radicular apresentou irregularidades correspondentes a antigas zonas de reabsorção que, independentemente das suas dimensões, se assumiram como acontecimentos normais produzidos por lesões intermitentes da superfície radicular durante o mecanismo fisiológico de mastigação e que, por tal, foram prontamente reparadas pela aposição de novo cimento celular.

Na porção mais apical da raiz, a espessura do cimento radicular surgiu aumentada em algumas secções, particularmente do lado mesial das raízes, correspondente ao lado de tensão fisiológica, devido à presença de cimento celular de fibras intrínsecas que recobria o cimento acelular a partir do terço médio radicular. Em alguns casos, este cimento celular era particularmente abundante, de aspeto globular, de distribuição irregular e contendo um grande número de cementócitos. De referir que o cimento celular de fibras intrínsecas iniciou a sua formação quando o dente entrou em oclusão e tem uma velocidade de síntese superior à do cimento acelular, pelo que os cementoblastos ficam retidos na matriz, designado-se de cementócitos. As suas linhas incrementais encontram-se mais afastadas, sendo mais espessas e irregulares.

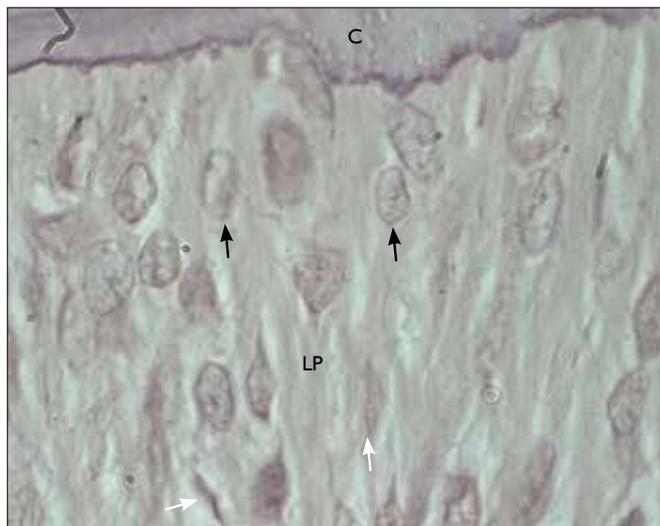


Figura 2.10 – Aspeto histológico do ligamento periodontal e da superfície radicular, no qual se observam fibroblastos ligamentares (seta branca) e cementoblastos (seta preta), estes últimos adjacentes à superfície radicular. H.E., x1000 no original. (C - cimento; LP - ligamento periodontal).

O osso alveolar apresentou-se com o seu aspeto característico, sendo possível observar a presença de osteoblastos adjacentes à superfície alveolar (Figura 2.11). A superfície do osso alveolar, apesar de íntegra, apresentou-se algo irregular na maior parte das secções, o que parece traduzir a existência de intensos processos de remodelação do tecido ósseo alveolar (Figuras 2.13 a 2.16). Em algumas secções foi mesmo patente a presença de alguns osteoclastos em lacunas de reabsorção na superfície periodontal do osso alveolar (Figura 2.17), principalmente no lado distal da raiz que não são de valorizar, dado estarem possivelmente relacionados com a intensa taxa de remodelação que ocorre devido ao movimento fisiológico.

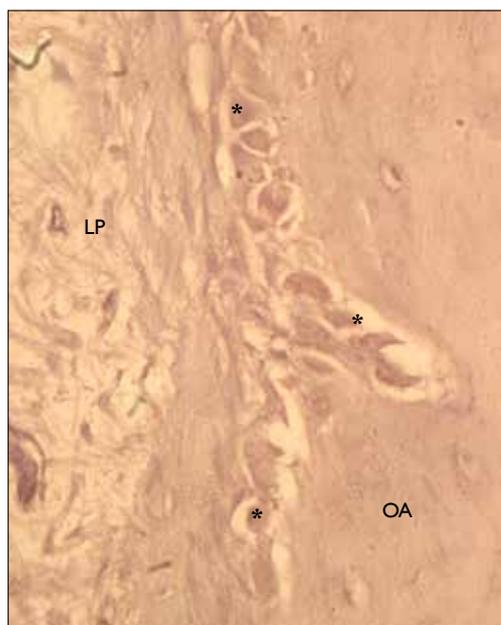


Figura 2.11 – Corte histológico onde é visível um cone de reabsorção óssea na parede alveolar distal sujeita à força de pressão durante o movimento dentário fisiológico. Observam-se osteoblastos (\*) alinhados quer ao longo de toda a superfície alveolar quer no interior do cone de reabsorção. H.E., x400 no original. (OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

Foram também visíveis em toda a extensão de ambas as superfícies alveolares, mesial e distal, linhas de reversão que se foram tornando mais pronunciadas desde do terço médio até ao ápex, sendo, no entanto, mais proeminentes no lado mesial (Figura 2.12). Além disso, foram também observados vasos sanguíneos de diferentes diâmetros distribuídos ao longo de todo o ligamento periodontal, estando, no entanto, particularmente presentes junto à parede do osso alveolar do lado distal da raiz associado à compressão durante o movimento fisiológico. Estes dois fenómenos são característicos da remodelação óssea que aqui ocorreu.

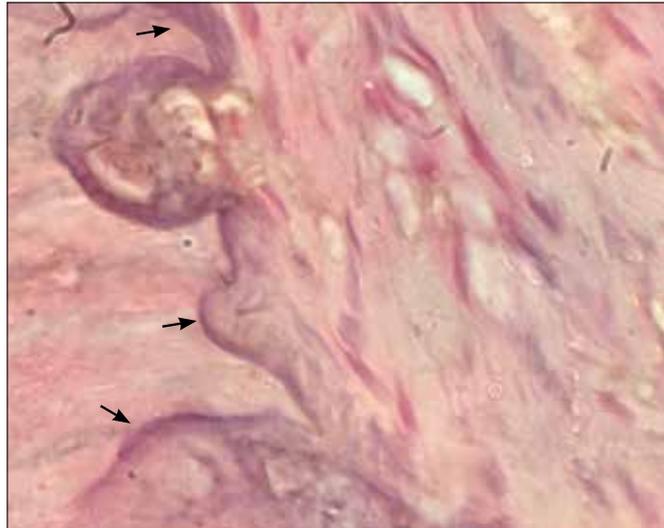


Figura 2.12 – Aspeto histológico das linhas de reversão, traduzindo o intenso processo de remodelação do tecido ósseo alveolar durante o movimento dentário. H.E., x1000 no original.

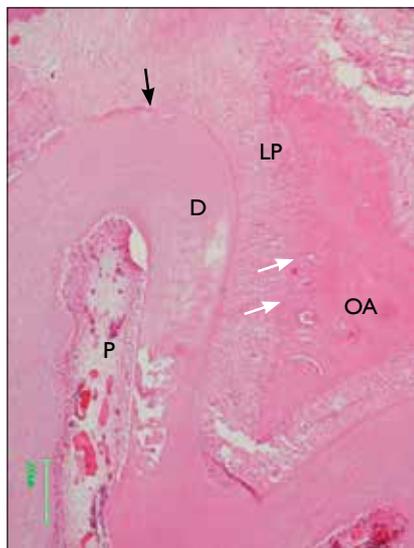


Figura 2.13 – Aspeto histológico da raiz mesial de M1, na qual está patente a morfologia conservada do periodonto e do septo ósseo inter-radicular. São visíveis fenómenos incipientes de reabsorção óssea (seta branca) no lado distal associados à migração fisiológica do dente. Em apical observa-se uma pequena lacuna de reabsorção radicular (seta preta) que poderá estar associada à função fisiológica da mastigação. A polpa dentária apresenta-se bem vascularizada. H.E., x40 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; P - polpa).

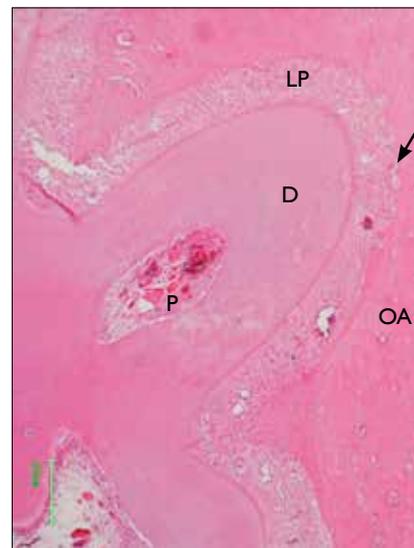


Figura 2.14 – Aspeto histológico da raiz distal de M1, onde são visíveis zonas de reabsorção óssea (seta) mais extensas no lado distal, associadas à compressão durante o movimento dentário fisiológico. Observa-se a distribuição dos vasos sanguíneos ao longo de todo o ligamento periodontal, encontrando-se estes mais hiperémicos junto à superfície distal em que a remodelação é mais intensa. H.E., x40 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; P - polpa).

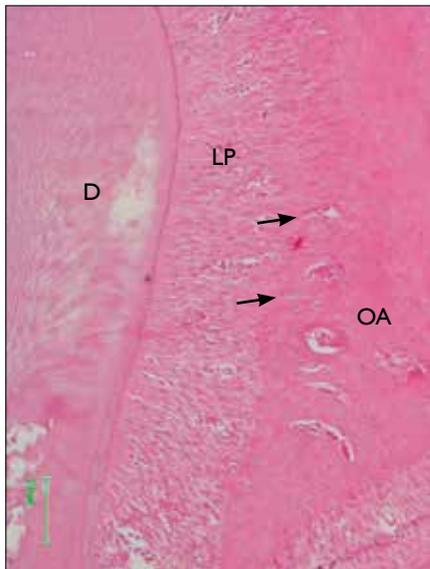


Figura 2.15 – Maior ampliação de uma área representada na Figura 2.13 mostrando o lado distal de pressão da raiz mesial de M1, onde são notórios processos de remodelação óssea da parede alveolar (seta), bem como a orientação oblíqua das fibras de Colagénio. H.E., x100 no original. (D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

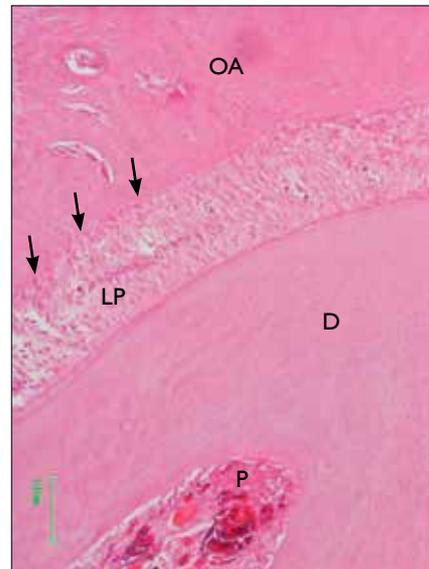


Figura 2.16 – Maior ampliação da Figura 2.14 correspondente ao lado mesial da raiz distal de M1, sujeito a forças de tensão durante a migração fisiológica, onde é visível a integridade quer da parede óssea alveolar quer da superfície radicular durante a migração fisiológica. São visíveis osteoblastos dispostos ao longo de toda a superfície alveolar (seta). H.E., x100 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; P - polpa).

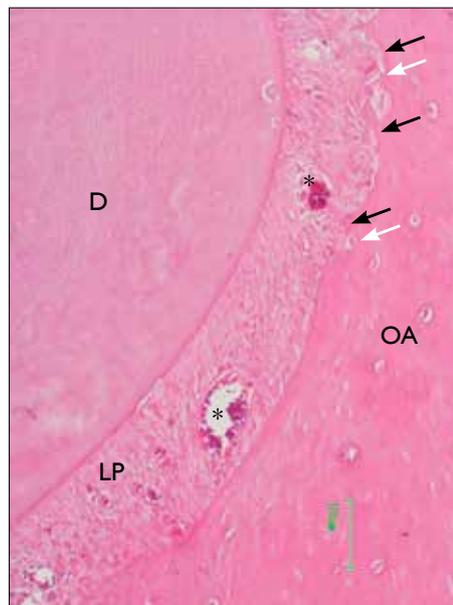


Figura 2.17 – Maior ampliação da Figura 2.14 correspondente ao lado distal da raiz distal de M1, sujeito a forças de pressão durante a migração fisiológica, onde é visível reabsorção mais intensa da superfície alveolar, surgindo lacunas (seta preta) com osteoclastos (seta branca) no seu interior. Os vasos sanguíneos surgem aqui mais hiperémicos (\*). H.E., x100 no original. (D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

Nos estudos por IHC verificou-se a existência de uma imunomarcação ténue para o TGF- $\beta$ 1. De facto foi visível uma marcação positiva de algumas células com fenótipo de cementoblastos (Figura 2.18), no lado de pressão do movimento, o que traduz a expressão de TGF- $\beta$ 1. No lado de tensão mesial não foi possível identificar qualquer tipo celular a expressar o TGF- $\beta$ 1 (Figura 2.19).

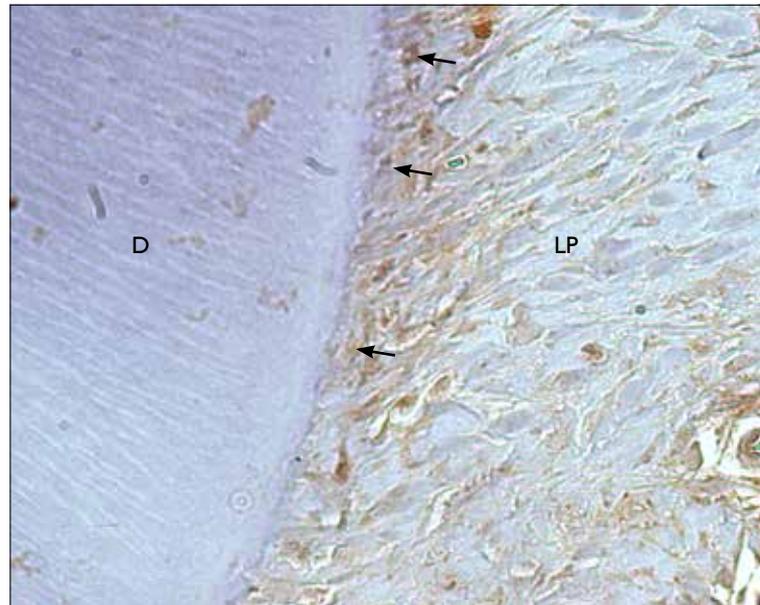


Figura 2.18 – Aspeto histológico do lado de pressão do movimento fisiológico, no qual se observam células com fenótipo de cementoblastos (seta) a expressarem o TGF- $\beta$ 1. x400 no original.  
(D - dente; LP - ligamento periodontal).

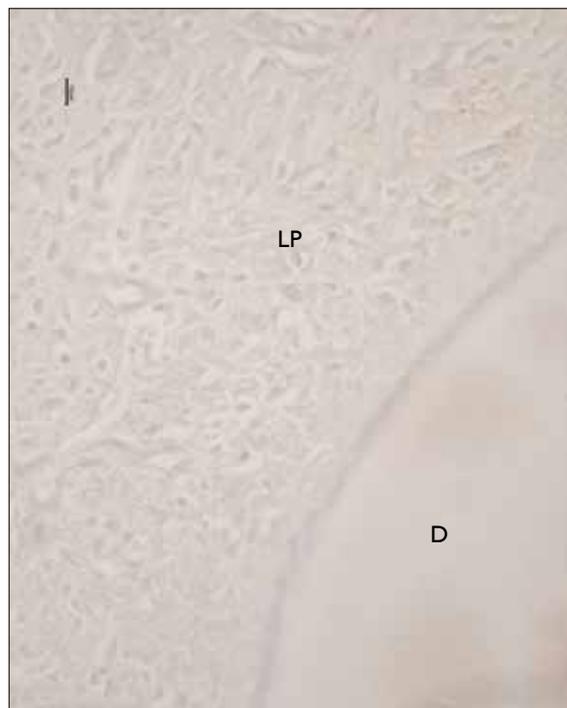


Figura 2.19 – Aspeto histológico do lado de tensão, evidenciando a ausência de expressão do TGF- $\beta$ 1. x200 no original.  
(D - dente; LP - ligamento periodontal).

Relativamente à Smad2 observou-se a imunomarcação ao longo de todo o periodonto analisado, tanto no lado de pressão (Figuras 2.20 e 2.21) como no lado de tensão (Figura 2.22), sendo visível fibroblastos (Figura 2.23), cementoblastos, osteoblastos, osteócitos células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos a expressarem a proteína.

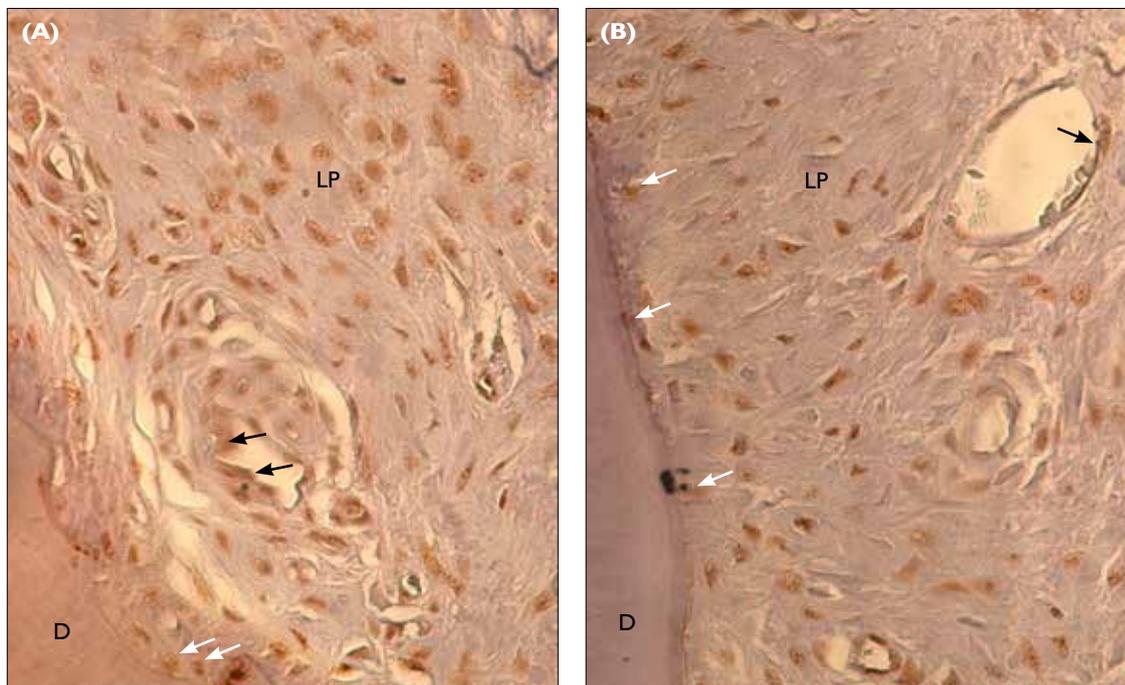


Figura 2.20 – (A) Corte histológico do lado de pressão, sendo visível os fibroblastos, cementoblastos (seta branca) células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta preta) a expressarem Smad2. São visíveis também na superfície radicular lacunas de reabsorção. (B) Corte histológico semelhante, onde fibroblastos, cementoblastos (seta branca) e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta preta) a expressarem Smad2. x400 no original. (D - dente; LP - ligamento periodontal).

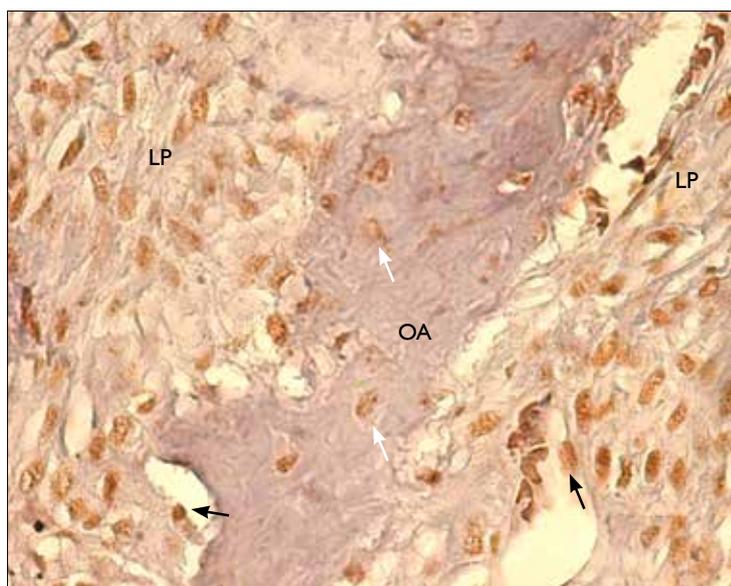


Figura 2.21 – Aspeto histológico do septo inter-dentário entre M1 e M2 e respetivo ligamento periodontal, onde se observam fibroblastos, células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta preta), osteoblastos e osteócitos (seta branca) a expressarem Smad2. x400 no original. (OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

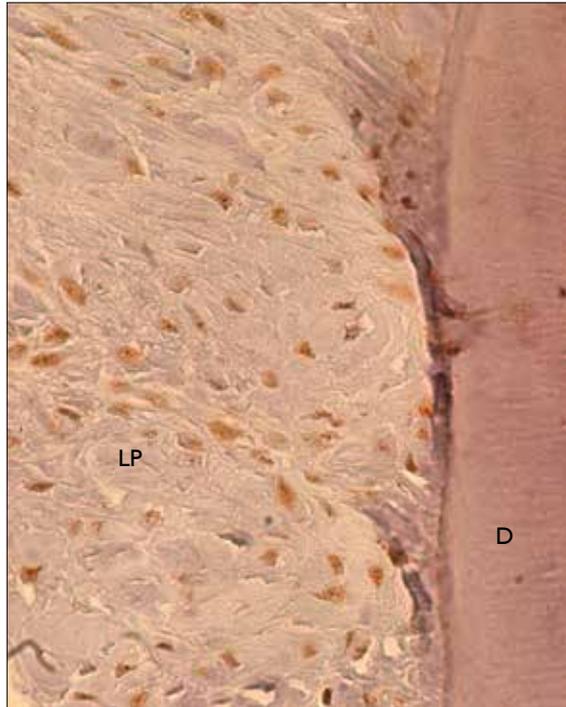


Figura 2.22 – Corte histológico mostrando, no lado de tensão, fibroblastos e cementoblastos a expressarem Smad2. x400 no original.  
(D - dente; LP - ligamento periodontal).

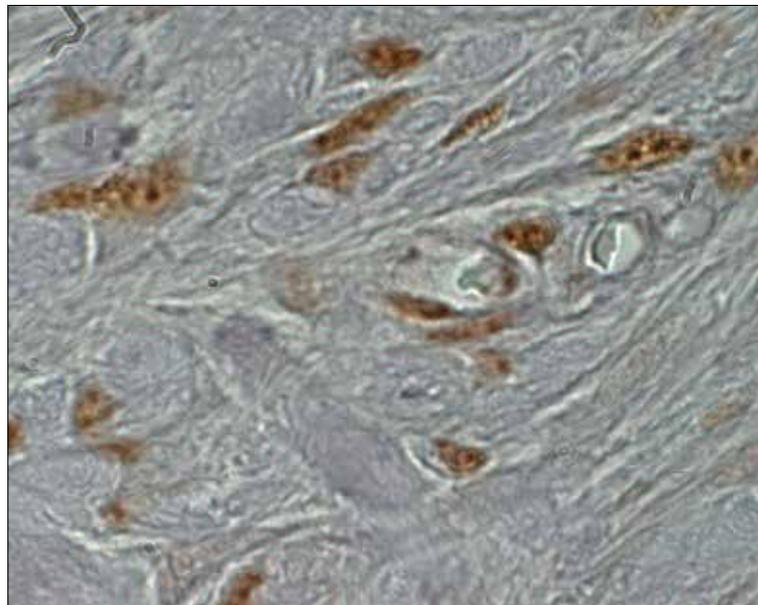


Figura 2.23 – Corte histológico do ligamento periodontal, onde são visíveis fibroblastos a expressarem Smad2. x1000 no original.

No que diz respeito aos estudos efetuados com recurso aos anticorpos para a Smad3 não foi possível observar, ao longo de todo o ligamento periodontal, qualquer marcação positiva para esta proteína (Figura 2.24).

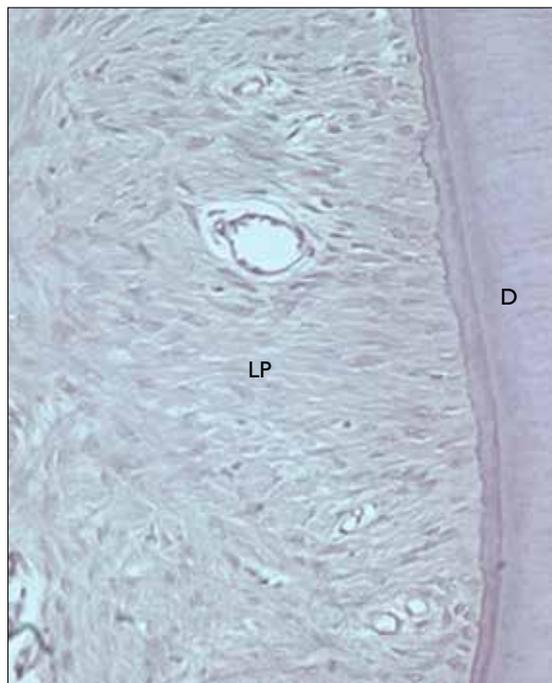


Figura 2.24 – Aspeto histológico do lado de tensão mesial de M1, evidenciando a ausência de expressão da Smad3. x200 no original.  
(D - dente; LP - ligamento periodontal).

Relativamente à IL-10, observou-se a sua expressão moderada nos fibroblastos, nas células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos e nos cementoblastos ao longo de todo o ligamento periodontal (Figuras 2.25 e 2.26). Por sua vez, não foi detetada qualquer expressão positiva nas células constituintes do tecido ósseo.

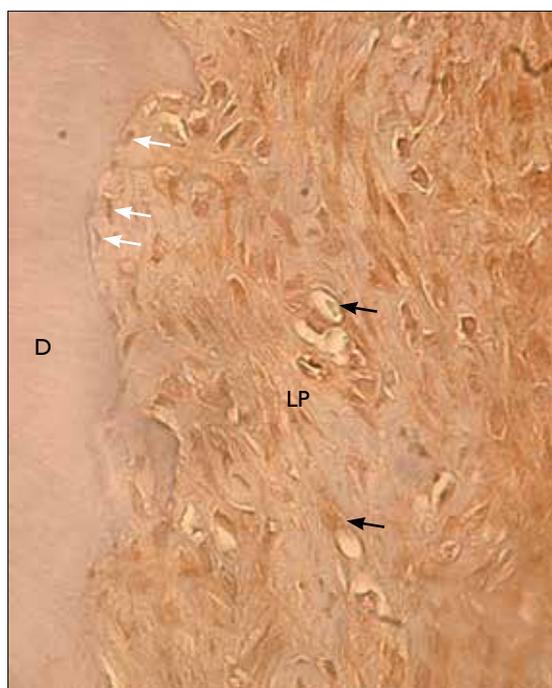


Figura 2.25 – Imagem histológica do lado de pressão do movimento, sendo observados fibroblastos, células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta preta) e cementoblastos (seta branca) em processo ativo de síntese, a expressarem IL-10. x400 no original.  
(D - dente; LP - ligamento periodontal).

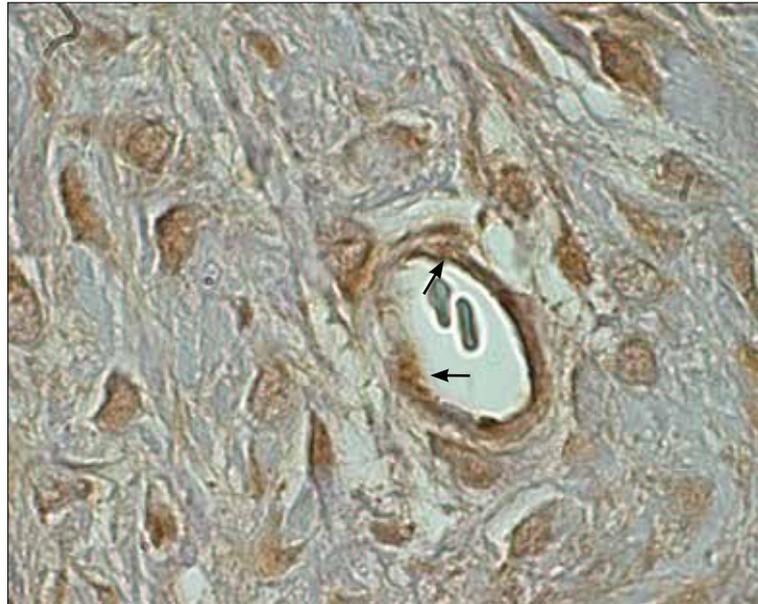


Figura 2.26 – Corte histológico mostrando a expressão da IL-10 pelos fibroblastos e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta). x1 000 no original.

De referir que não foi também detetada a imunomarcação positiva para a proteína  $\alpha$ -Sma no ligamento periodontal, pelo que se presume que nesta fase não estejam presentes células com fenótipo de miofibroblastos. Por outro lado, foi identificada a presença desta proteína em células do músculo liso, presentes nas paredes de alguns vasos sanguíneos, o que pôde funcionar como um controlo positivo interno para a imunomarcação.

Os resultados da deteção por IHC da proteína PCNA revelaram que não foi detetada marcação positiva em nenhum dos lados do movimento fisiológico, sugerindo que as células do periodonto se encontravam quiescentes (Figura 2.27).

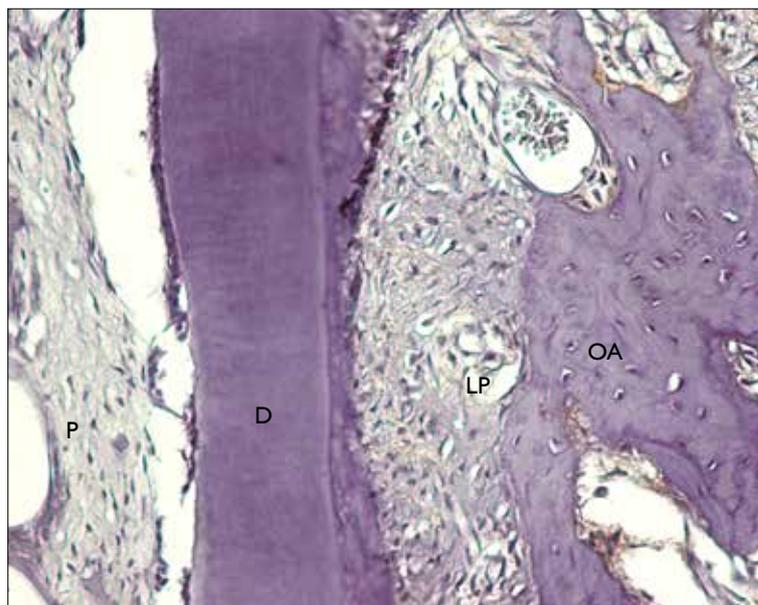


Figura 2.27 – Aspeto histológico representativo do periodonto, no lado de pressão do movimento fisiológico, após marcação para o PCNA, não se observando imunorreacção positiva nas células do ligamento periodontal. HE, 200x no original.

(D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; P - polpa).

### 2.2.2 Grupo T01 – Fase ativa com manipulação, elastômero mantido durante 24 horas

Neste grupo experimental, foram detetadas alterações na superfície do osso alveolar propriamente dito, tanto no lado mesial como no lado distal das raízes do 1º molar maxilar, sendo de registrar a presença de áreas de reabsorção direta principalmente em locais associados à compressão do ligamento, isto é, em mesial das raízes, a nível dos terços médio e coronário. Neste lado do movimento dentário, observou-se num grande número de secções a existência de lacunas de reabsorção óssea incipientes, sendo ainda visíveis linhas de reversão (Figuras 2.32 e 2.34) que traduzem os fenómenos de remodelação que aqui ocorreram. Contudo, em alguns casos foi notória a presença de processos de reabsorção óssea mais exuberante, com a presença de um grande número de lacunas de Howship com osteoclastos nelas alojados (Figuras 2.28, 2.30 a 2.33).

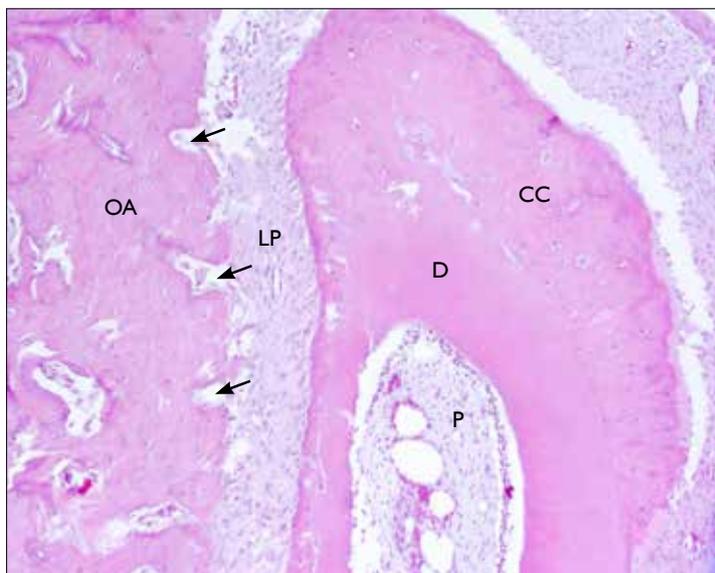


Figura 2.28 – Aspeto histológico da raiz mesial de M1, onde é possível observar a frente de reabsorção óssea (setas) no lado de compressão e a acentuada neoformação de cimento celular no lado de tensão. H.E., x100 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; P - polpa; CC - cimento celular).

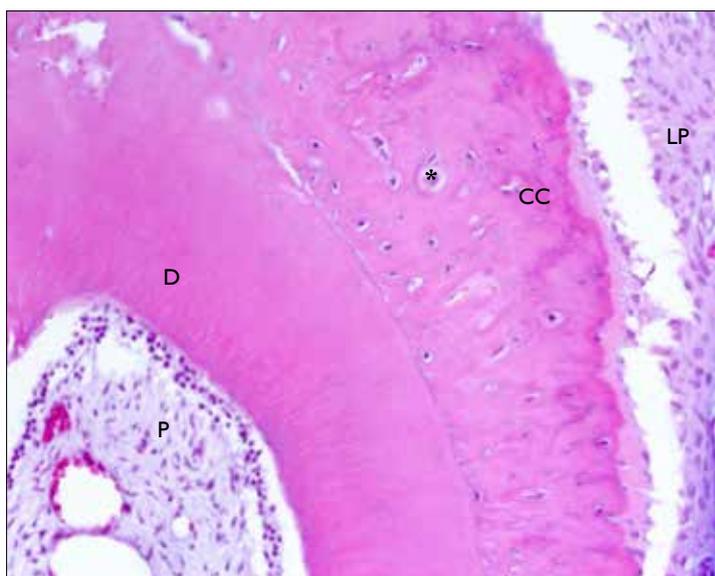


Figura 2.29 – Maior ampliação da imagem anterior pondo em evidência a existência dos cementoblastos (\*) e a formação de cimento celular no lado sujeito a tensão. H.E., x200 no original. (D - dentina; LP - ligamento periodontal; P - polpa; CC - cimento celular).

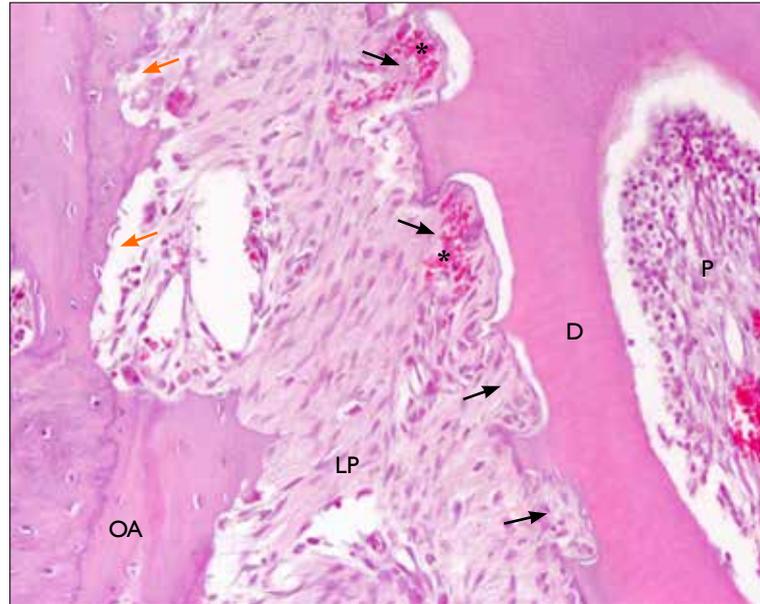


Figura 2.30 – Corte histológico de uma área sujeita a pressão em mesial da raiz mesial de M1, onde são visíveis fenômenos de reabsorção ativa quer na superfície radicular (seta preta) quer na parede óssea alveolar (seta laranja). De salientar a existência de pequenas zonas hemorrágicas (\*) no ligamento periodontal, principalmente adjacentes às áreas de reabsorção radicular. H.E., x200 no original.  
(D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; P - polpa).

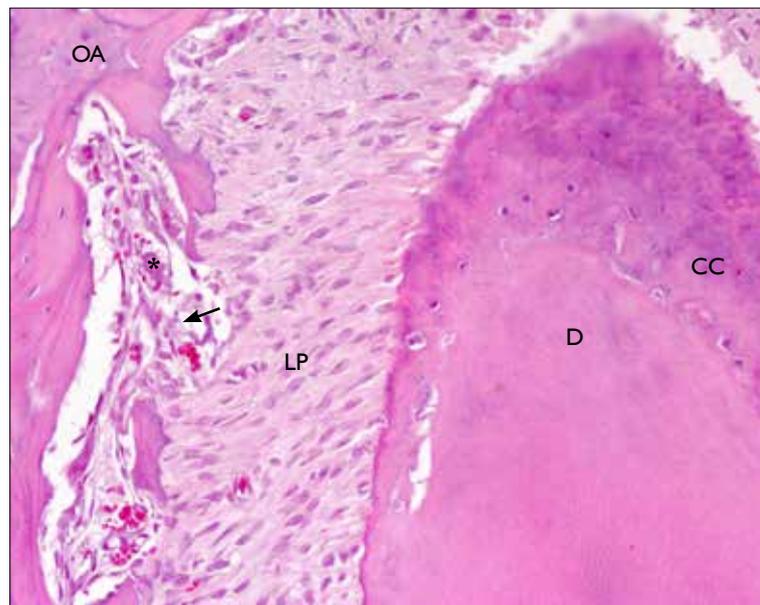


Figura 2.31 – Aspeto histológico típico do periodonto na área de pressão da raiz mesial de M1. São visíveis processos de reabsorção óssea direta (seta) com a presença de osteoclastos (\*). De notar a manutenção da integridade radicular e do ligamento periodontal. É visível também a maior espessura de cemento celular no lado distal. H.E., x200 no original.  
(D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CC - cemento celular).

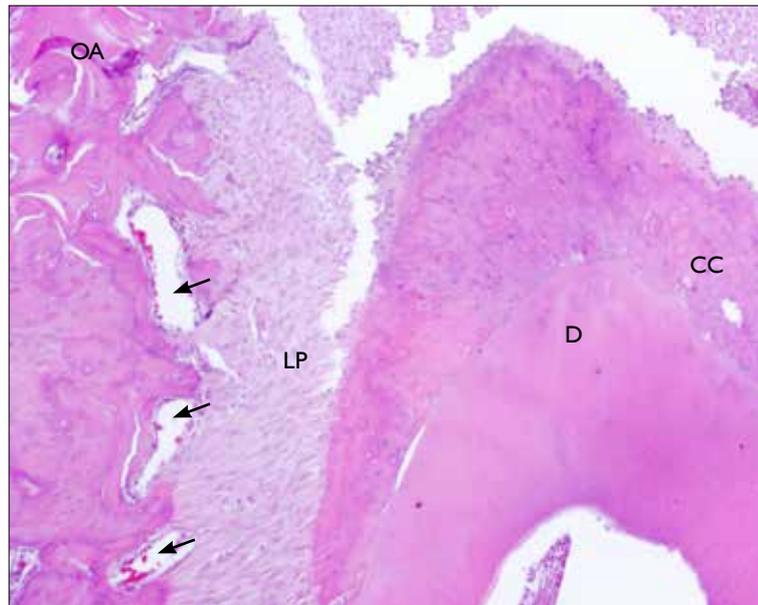


Figura 2.32 – Aspeto histológico da zona apical, onde se observa a formação de tecido ósseo *de novo* ao longo da parede óssea alveolar. De salientar a integridade da superfície radicular bem como a normal organização do ligamento periodontal. Junto à parede alveolar em remodelação são visíveis vasos sanguíneos (seta). H.E., x200 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CC - cimento celular).

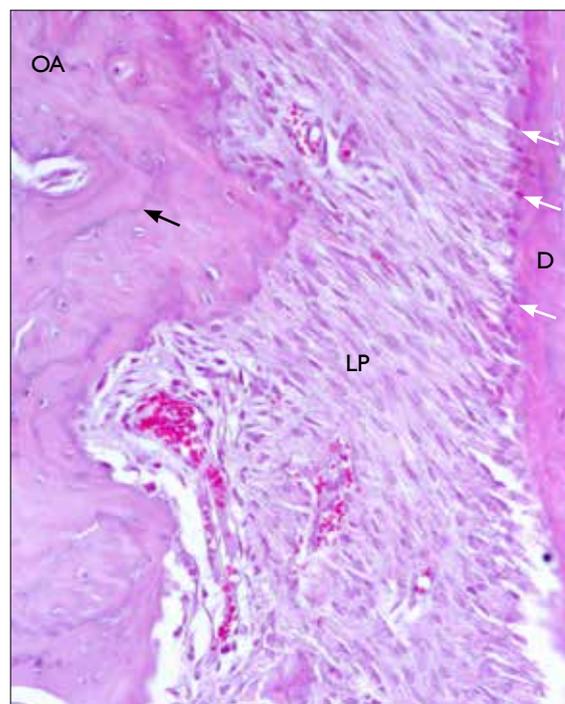


Figura 2.33 – Corte histológico do lado mesial do periodonto da raiz mesial de M1, ilustrando a intensa remodelação do tecido ósseo alveolar, traduzido pelo grande número de linhas de reversão (seta preta) e pela presença de vasos sanguíneos. De registar a manutenção da integridade do ligamento periodontal e o aspeto em paliçada dos cementoblastos (seta branca) num processo ativo de formação de cimento acelular. H.E., x200 no original. (D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

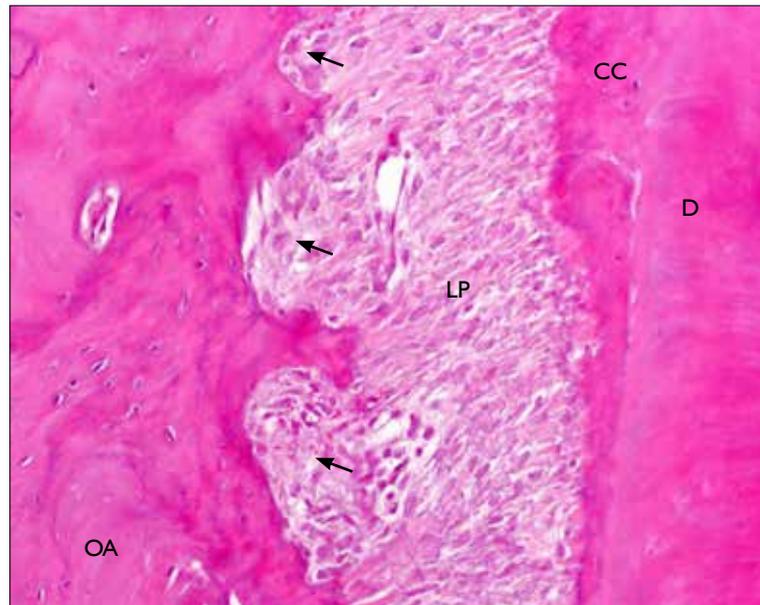


Figura 2.34 – Imagem histológica do periodonto na zona de pressão, na qual são evidentes as lacunas de reabsorção do tecido ósseo (seta) e o aspeto hiper celular do ligamento periodontal. H.E., x200 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CC - cimento celular).

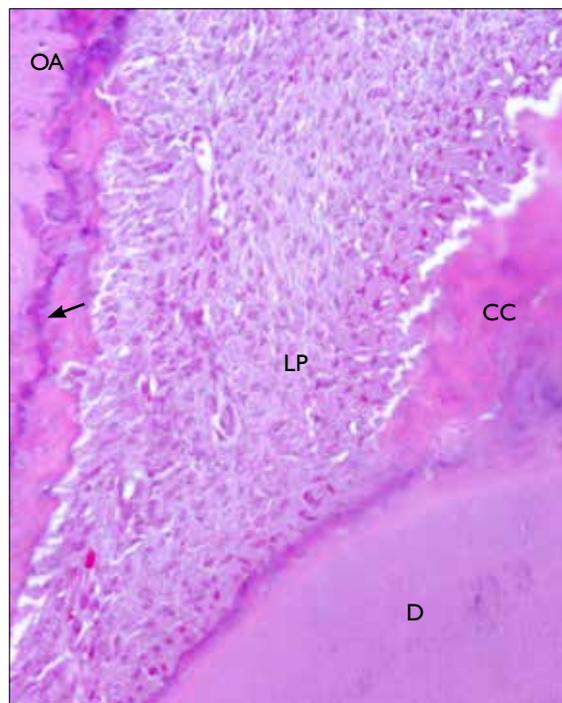


Figura 2.35 – Imagem histológica ilustrando a presença de linha de reversão (seta) na superfície alveolar sujeita a uma força, que devido à versão do dente deverá ser de pressão nesta região apical, traduzindo os processos de remodelação do tecido ósseo da parede óssea alveolar. H.E., x200 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CC - cimento celular).

No lado distal do movimento em que esteve atuante uma força de tensão, foram visíveis, na maior parte das secções dos animais deste grupo, linhas de reversão (Figuras 2.37 e 2.39) traduzindo a aposição óssea que aqui ocorreu. De referir, no entanto, que apesar de não ser significativo, foram observadas pontualmente neste lado do movimento, imagens histológicas de reabsorção direta intensa da superfície alveolar que poderão estar relacionadas com a atuação de forças de pressão durante a migração fisiológica que ocorreu até ao dia anterior (Figura 2.36). Contudo, de um modo geral, as lacunas de reabsorção direta observadas foram bastante discretas, ao nível do terço apical, podendo considerar-se não só como parte dos mecanismos fisiológicos de remodelação do osso alveolar propriamente dito mas também como resultado da compressão devida ao movimento de versão que o dente sofreu (Figura 2.37).

Foi ainda perceptível, na maior parte das secções, a diminuição relativa da espessura do ligamento periodontal no lado mesial das raízes, principalmente ao nível do terço coronário da raiz mesial (Figura 2.36).

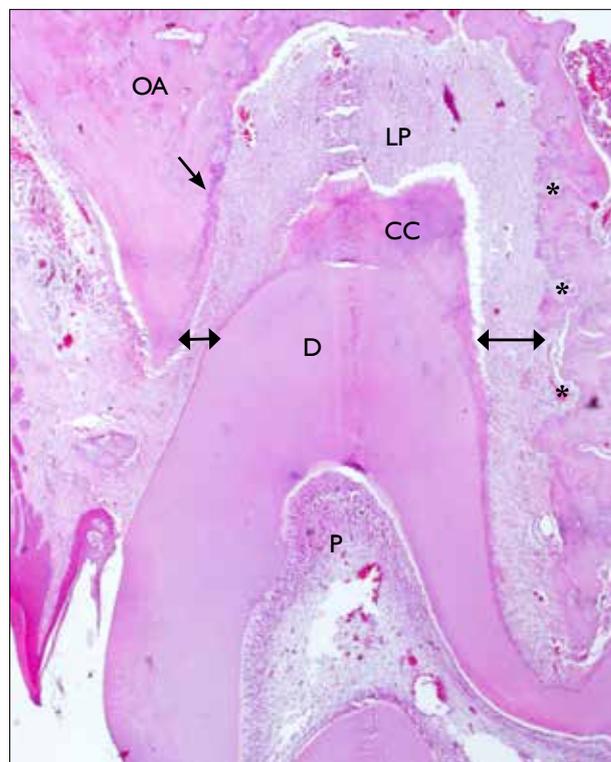


Figura 2.36 – Aspeto histológico da raiz mesial da secção que evidência a persistência às 24 horas de fenómenos associados à migração fisiológica. De referir a existência no tecido ósseo alveolar de cones de reabsorção óssea direta (\*) no lado de tensão distal e a neoformação óssea no lado de pressão mesial, sendo notória a linha de reversão (seta preta), demonstrando a remodelação que aqui ocorreu. No terço apical da raiz observa-se a camada de cimento celular. É no entanto já notória a diminuição de espessura do ligamento periodontal em mesial (setas duplas). H.E., x40 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; P - polpa; CC - cimento celular).

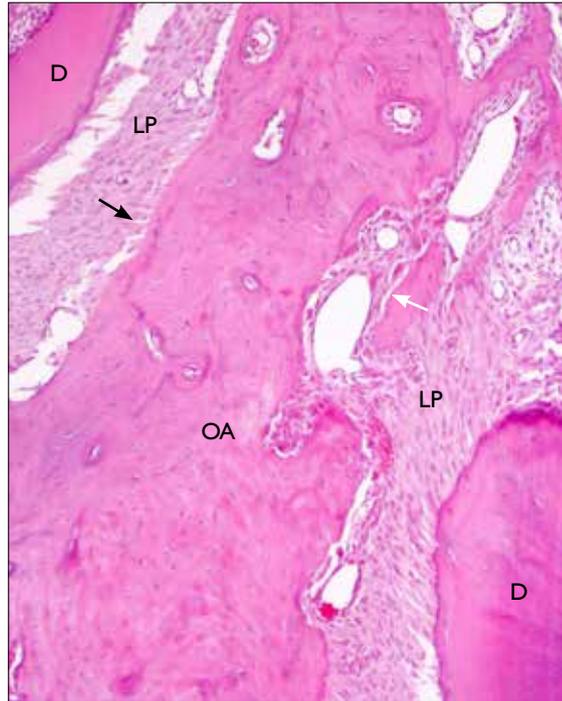


Figura 2.37 – Imagem histológica do septo inter-radicular evidenciando a existência de fenômenos de reabsorção/remodelação no lado de compressão da raiz distal de M1 (seta branca) e de neoformação óssea (seta preta) no lado oposto de tensão associado à raiz mesial. H.E., x100 no original.  
(D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

Em todos os animais deste grupo, as fibras de Colagénio do ligamento periodontal presentes no lado distal apresentaram-se distendidas e orientadas de maneira oblíqua em relação à superfície de dentina radicular. As células presentes entre as fibras de Colagénio estão dispostas, no sentido apical, desde o processo alveolar até à superfície radicular. Neste lado do cemento radicular verificou-se a perda da paliçada celular a ele adjacente.

No lado mesial das raízes, o ligamento periodontal surgiu mais desorganizado quando comparado com o lado distal de ambas as raízes. Foram detetadas áreas de ligeira hialinização nas quais foi perceptível a presença de alguns núcleos picnóticos, particularmente junto à superfície radicular.

Na maior parte das secções observou-se ainda, na totalidade do ligamento periodontal, proliferação mesenquimatosa sob a forma de hiper celularidade (Figura 2.34), exceto nas áreas em que estava presente hialinização. Foi também observado um aumento da vascularização, encontrando-se estes vasos sanguíneos distribuídos mais perto da parede alveolar, refletindo o alto metabolismo e rápido *turnover* dos constituintes do tecido ósseo alveolar. Nas secções de quatro animais foi observada hemorragia ao nível do ligamento periodontal (Figura 2.30).

Apenas num dos animais deste grupo foi visível a presença de células com perfil de PMNs, o que poderá indicar a existência de contacto entre o ligamento periodontal e a cavidade oral, não estando este acontecimento relacionado, *a priori*, com a indução de movimento dentário.

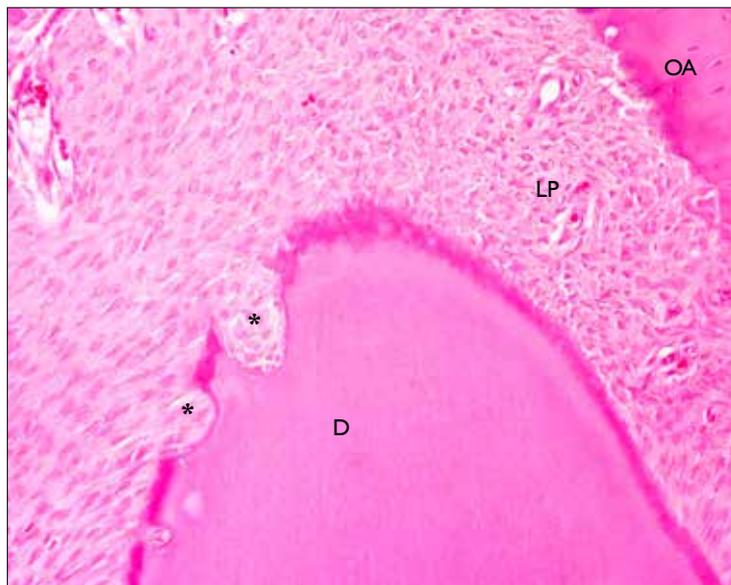


Figura 2.38 – Aspeto histológico da região apical da raiz mesial de M1, onde é visível a presença de lacunas de reabsorção (\*) sobre a superfície radicular; atingindo já a dentina radicular. H.E., x200 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).



Figura 2.39 – Aspeto histológico da região inter-radicular pondo em evidência as diferenças na remodelação da crista óssea alveolar dependentes das forças que sobre ela atuam. No lado mesial de pressão da raiz distal são visíveis osteoclastos alojados nas suas lacunas (seta preta), ao longo de toda a parede óssea, promovendo a reabsorção do tecido ósseo alveolar.

No lado de tensão da raiz mesial é perceptível a aposição de novo osso com a característica linha de reversão (seta branca).

De registrar uma pequena lacuna de reabsorção na superfície radicular (seta amarela) e o aspeto hiperémico dos vasos sanguíneos intrapulpares da raiz distal. H.E., x100 no original.

(D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; P - polpa).

Em relação aos estudos por IHC, neste grupo experimental, foi apenas detetada uma expressão ténue do TGF- $\beta$ 1 nos fibroblastos presentes no ligamento periodontal no lado de pressão. De registrar, porém, que no lado de tensão não foi detetada marcação positiva para este fator de crescimento, tal como no grupo de controlo. Adjacentes à superfície radicular foram observados também cementoblastos com uma imunomarcação positiva para o TGF- $\beta$ 1 (Figuras 2.40 e 2.41).

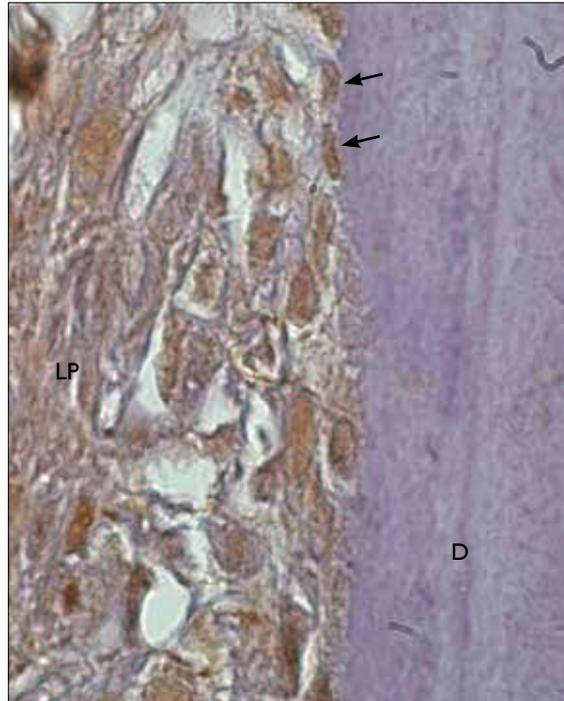


Figura 2.40 – Corte histológico do lado de pressão mesial, sendo patente a expressão pelos fibroblastos e cementoblastos (seta) do TGF- $\beta$ 1. x1000 no original. (D - dente; LP - ligamento periodontal).

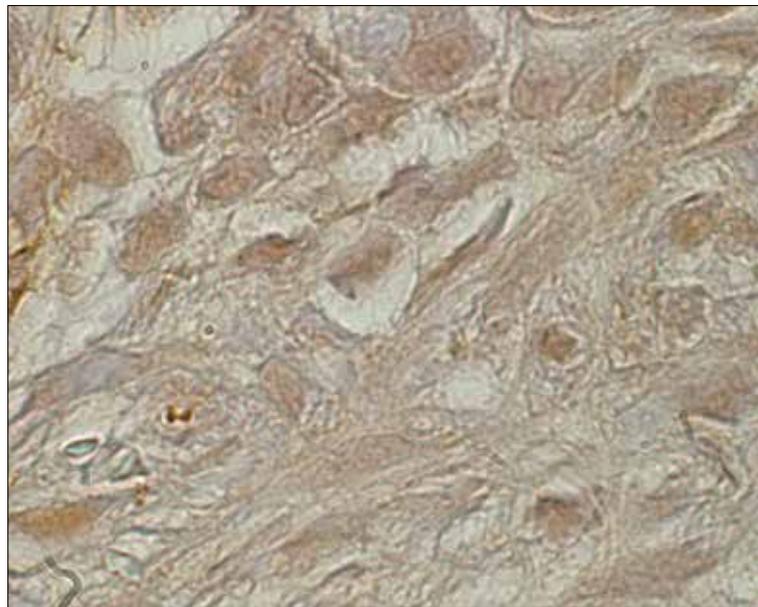


Figura 2.41 – Aspeto histológico do ligamento periodontal evidenciando a expressão do TGF- $\beta$ 1 pelos fibroblastos. x1000 no original.

No que concerne à imunomarcação para a Smad2, foi visível ao longo de todo o ligamento periodontal uma intensa marcação pelos fibroblastos, células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos, cementoblastos e osteócitos. De salientar que no lado de tensão, os cementoblastos apresentaram uma marcação mais intensa do que as restantes populações celulares para a Smad2 (Figuras 2.42 a 2.45).

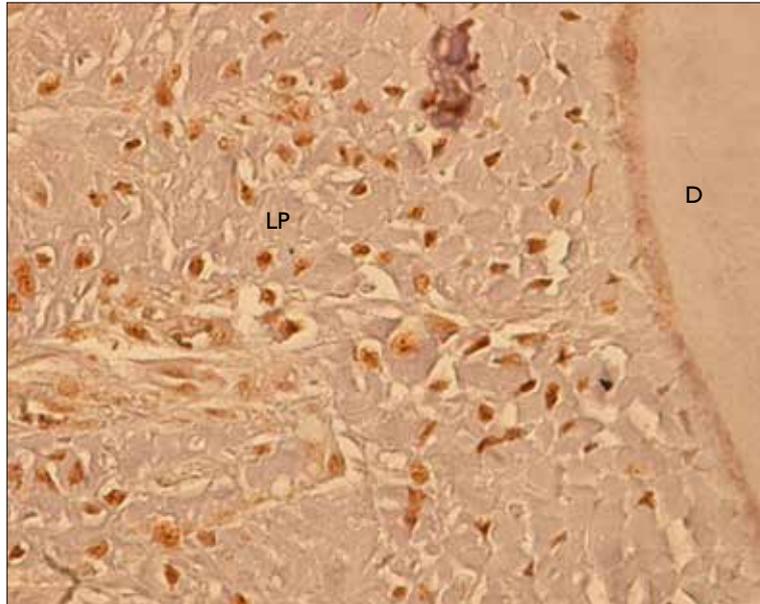


Figura 2.42 – Aspeto histológico do lado de pressão mesial, ilustrando a expressão intensa da Smad2 pelos fibroblastos. x400 no original.  
(D - dentina; LP - ligamento periodontal).



Figura 2.43 – Imagem histológica do lado de pressão, sendo patente a expressão da Smad2 pelos fibroblastos e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta). São também visíveis alguns osteócitos a expressarem Smad2. x 400 no original.  
(OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

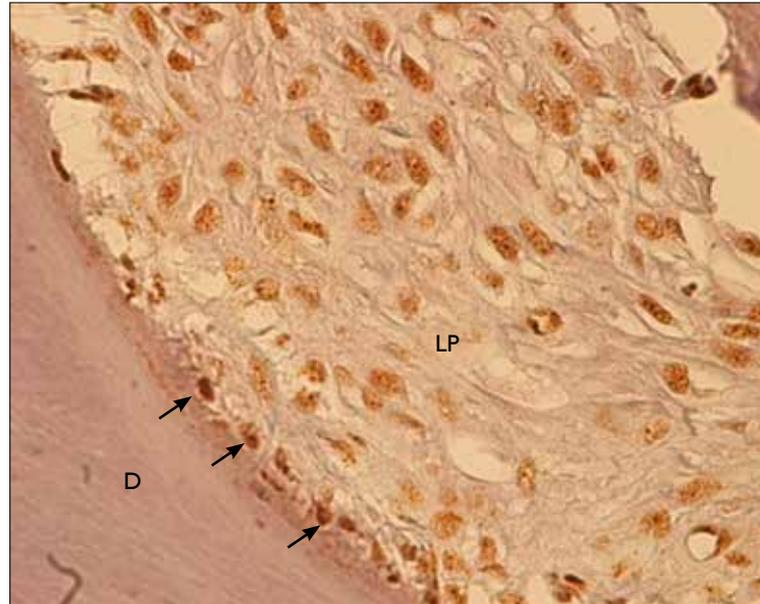


Figura 2.44 – Aspeto histológico do lado de tensão distal, mostrando a expressão da Smad2 pelos fibroblastos e cementoblastos (seta), estes últimos mais intensamente. x400 no original.  
(D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

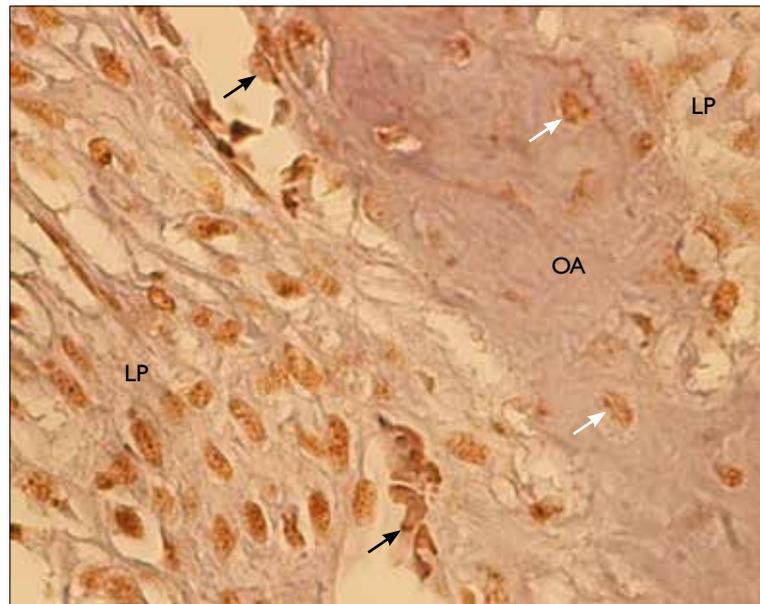


Figura 2.45 – Imagem histológica do lado de tensão ilustrando a expressão da Smad2 por fibroblastos, osteócitos (seta branca) e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta preta). x400 no original.  
(OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

Nos estudos de IHC efetuados para a Smad3, não foi possível observar qualquer imunomarcção positiva para esta proteína ao longo de todo o ligamento periodontal (Figura 2.46).



Figura 2.46 – Imagem histológica ilustrando a ausência de expressão da Smad3. x400 no original.  
(D - dente; LP - ligamento periodontal).

Relativamente à marcação para a IL-10, observou-se a sua expressão nos cementoblastos, cementócitos, fibroblastos e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos ao longo de todo o periodonto (Figuras 2.47 a 2.50). Neste grupo experimental já foram visíveis algumas células constituintes do tecido ósseo, particularmente os osteócitos, a expressarem esta citocina (Figuras 2.48 e 2.49).

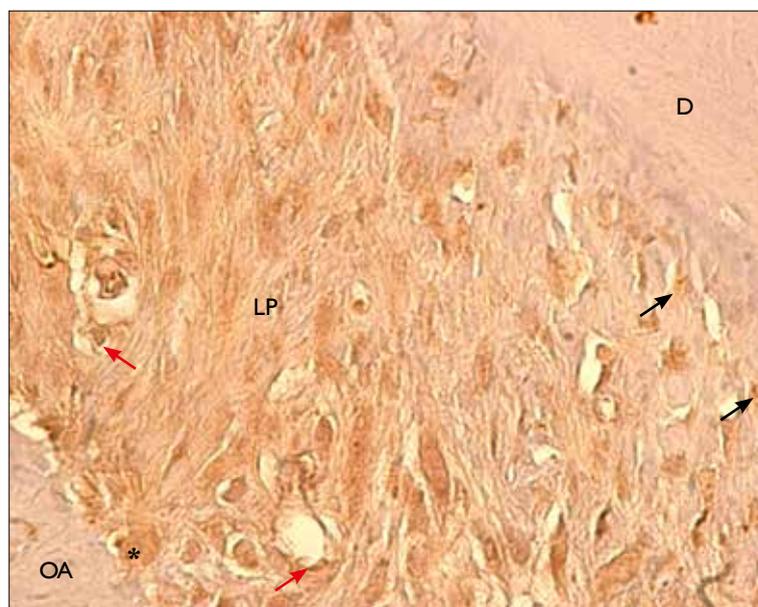


Figura 2.47 – Aspeto histológico do lado de pressão mesial. São visíveis fibroblastos, células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta vermelha), osteoclastos (\*) e alguns cementoblastos (seta preta) a expressarem IL-10. x400 no original.  
(D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

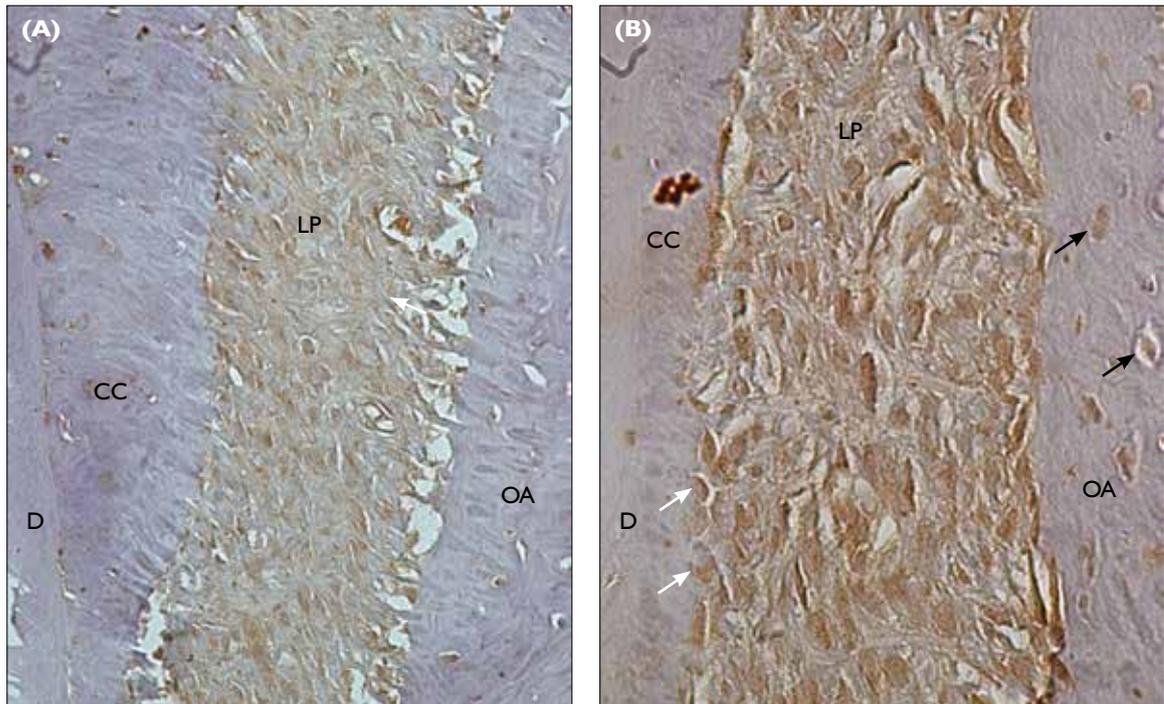


Figura 2.48 – (A) Aspeto histológico das estruturas do periodonto na zona de tensão, sendo patente a expressão da IL-10 pelos fibroblastos. x200 no original. (B) Maior ampliação de uma zona similar, onde é visível a expressão da citocina pelos fibroblastos, cementoblastos (seta branca) e osteócitos (seta preta). x400 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CC - cimento celular).

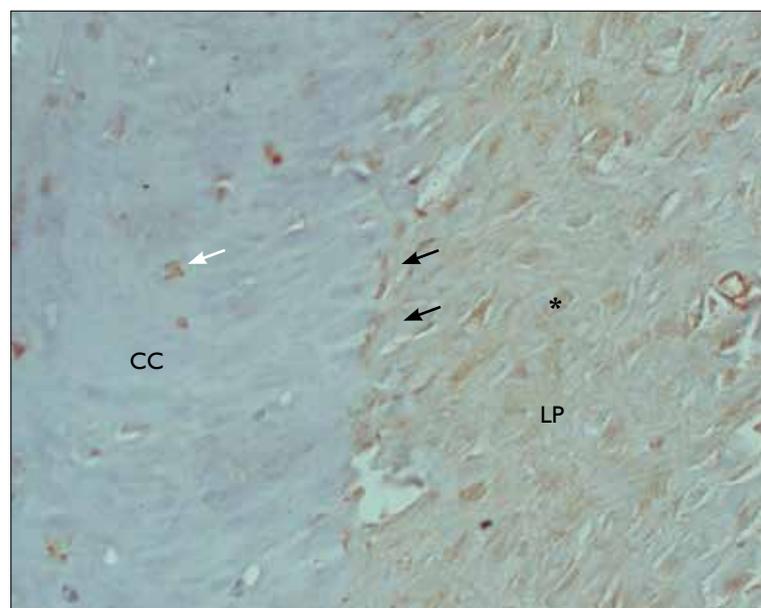


Figura 2.49 – Maior ampliação de uma região representada na imagem anterior (A), demonstrando a expressão da IL-10 pelos cementoblastos (seta preta), cementócitos (seta branca) e fibroblastos (\*). x200 no original. (LP - ligamento periodontal; CC - cimento celular).

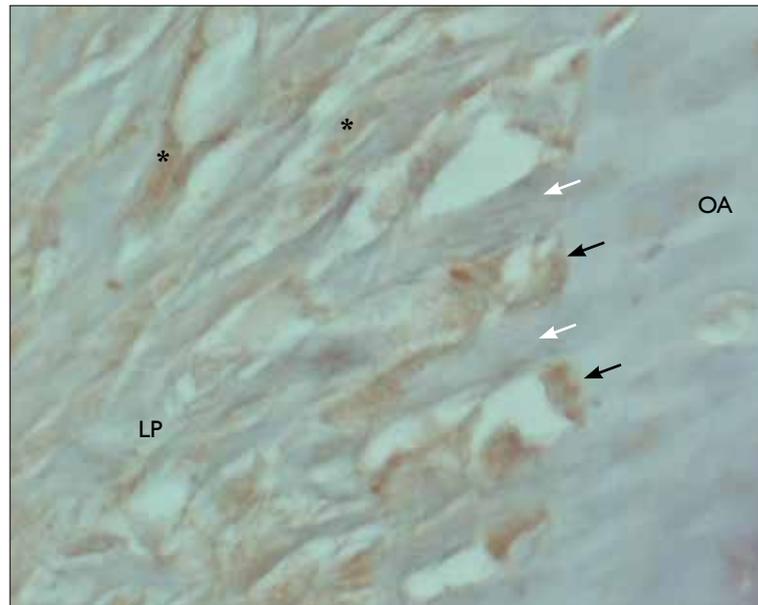


Figura 2.50 – Imagem histológica do ligamento periodontal ilustrando a expressão da IL-10 pelos osteoblastos do osso alveolar propriamente dito (seta preta) e pelos fibroblastos no lado de tensão (\*). De notar a nítida inserção das fibras de Sharpey no tecido ósseo (seta branca). x400 no original. (LP - ligamento periodontal; OA - osso alveolar).

Neste grupo experimental, continuou a não ser detetada a expressão de  $\alpha$ -Sma nos tecidos periodontais, exceto em células de músculo liso presentes em alguns vasos sanguíneos ligamentares (Figura 2.51).

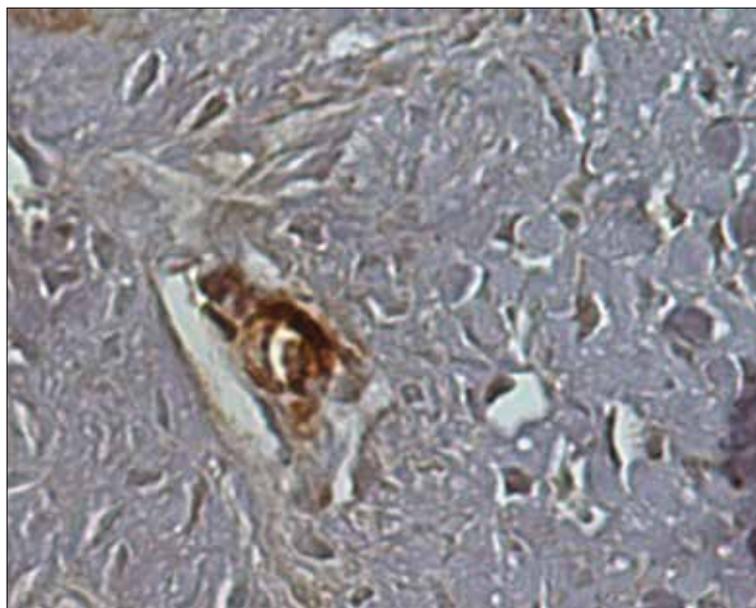


Figura 2.51 – Aspeto histológico ilustrando a ausência de expressão da  $\alpha$ -Sma no ligamento periodontal, sendo apenas visíveis células musculares lisas a expressarem a proteína. x400 no original.

Após um período experimental de 24h começou a ser possível observar uma ténue reação IHC positiva para o PCNA tanto nas células localizadas na zona central do ligamento periodontal como nas células adjacentes

ao cemento celular, que se supõem fibroblastos e cementoblastos-*like* respectivamente, em ambos os lados do movimento dentário (Figuras 2.52 e 2.53).

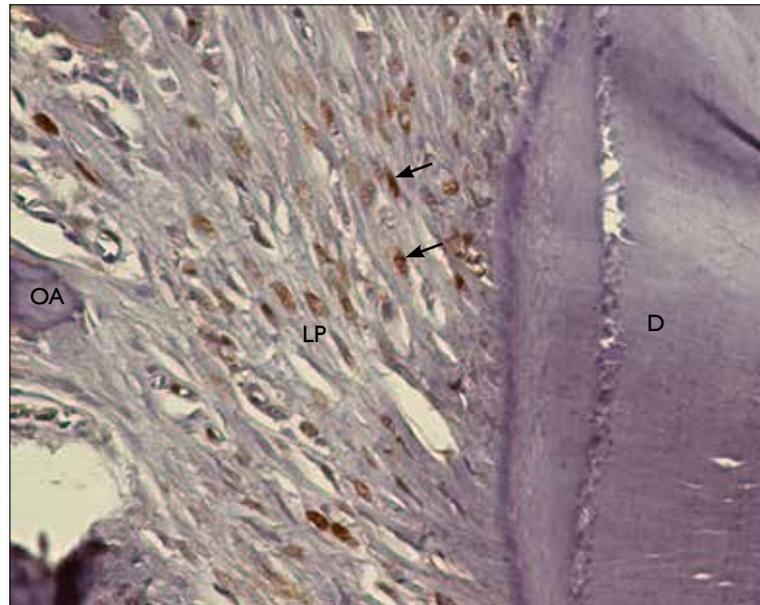


Figura 2.52 – Aspeto histológico do lado de pressão do movimento, sendo visível a expressão do PCNA nos fibroblastos (seta) do ligamento periodontal. 200X no original. (D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

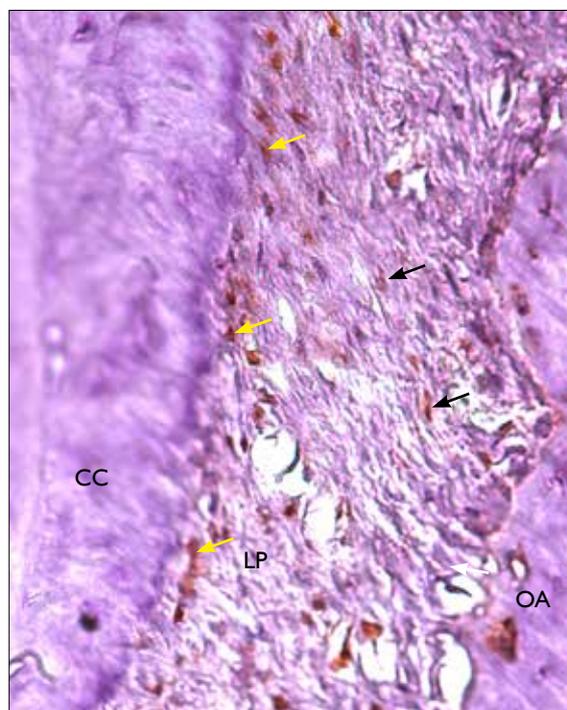


Figura 2.53 – Imagem histológica da reação de IHC para o PCNA, revelando a expressão quer nos fibroblastos (seta preta) do ligamento periodontal quer nos cementoblastos-*like* (seta amarela), no lado de tensão do movimento. 400X no original. (OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CC - cemento celular).

### 2.2.3. Grupo T02 - Fase ativa com manipulação, elastômero mantido durante 48 horas

Neste grupo experimental, a característica mais importante observada ao nível do ligamento periodontal foi a proliferação mesenquimatososa visível sob a forma de hiper celularidade. Contudo, no lado de pressão, particularmente na região adjacente à raiz dentária continuaram a ser visíveis áreas de hialinização, onde era aparente a diminuição do número de células ligamentares presentes (Figuras 2.54 a 2.56).

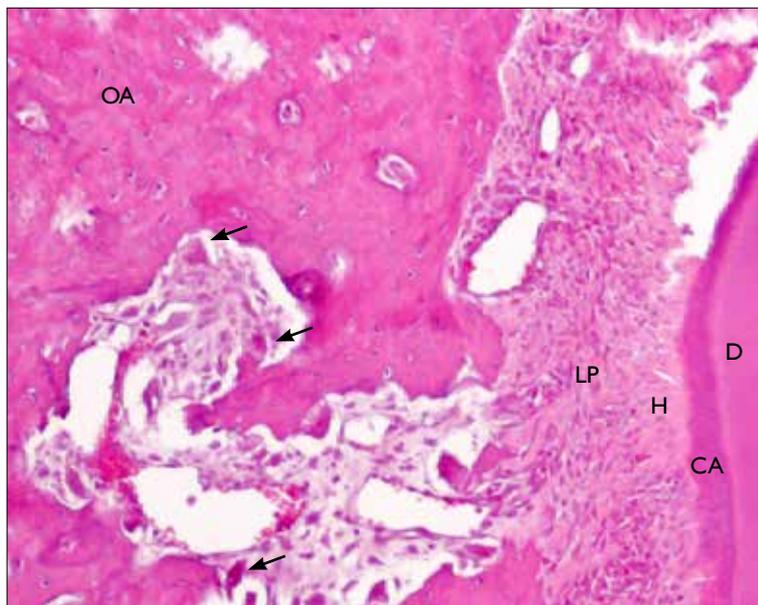


Figura 2.54 – Imagem histológica do lado de pressão, onde é visível um acentuado processo de reabsorção óssea direta com a presença de inúmeros osteoclastos (seta). No ligamento periodontal está patente uma hiper celularidade e, adjacente ao cimento acelular, são observadas pequenas zonas de hialinização. H.E., x100 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CA - cimento acelular; H - hialinização).



Figura 2.55 – Imagem histológica evidenciando a hiper celularidade presente no ligamento periodontal e uma área de hialinização adjacente ao cimento acelular. H.E., x400 no original. (D - dentina; LP - ligamento periodontal; CA - cimento acelular; H - hialinização).

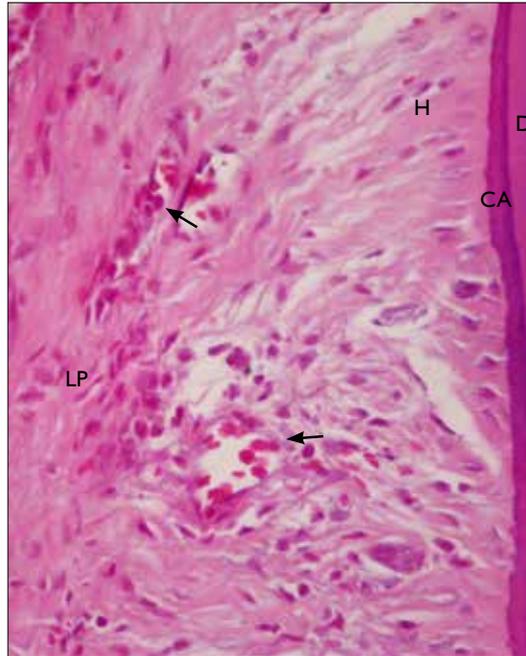


Figura 2.56 – Aspeto histológico do ligamento periodontal no lado de pressão onde se observa a existência de pequenos vasos hemorrágicos (seta) e um certo reforço de infiltrado inflamatório. São ainda visíveis algumas fibras de Sharpey e a diminuição de celularidade na zona de hialinização adjacente à raiz. H.E., x400 no original.  
(D - dentina; LP - ligamento periodontal; CA - cimento acelular; H - hialinização).

Neste grupo do estudo foi observada neoangiogénese, estando presentes microvasos particularmente junto à superfície periodontal do osso alveolar do lado mesial de compressão, principalmente da raiz mesial do 1º molar maxilar (Figura 2.57).

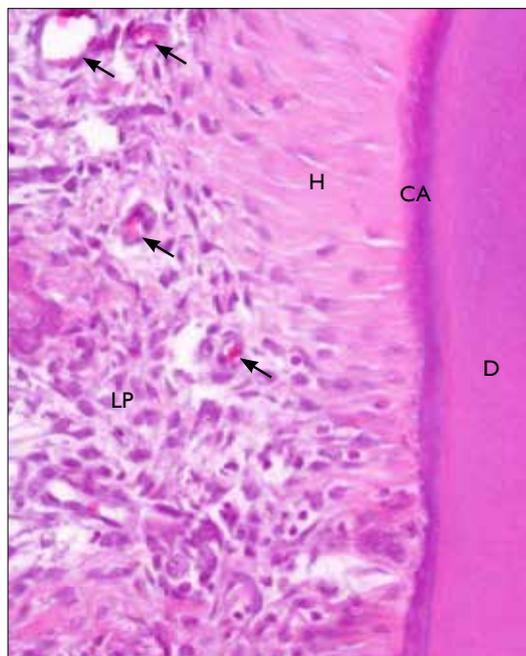


Figura 2.57 – Corte histológico do ligamento periodontal na face mesial da raiz mesial de M1, na qual é visível uma extensa área de hialinização adjacente à superfície radicular, numa zona que de acordo com Waldo e Rothblatt (1954) será de pressão. É visível também uma extensa angiogénese (seta) adjacente à área hialinizada acompanhada de hipercelularidade na porção do ligamento não afetada pela hialinização. H.E., x200 no original.  
(D - dentina; LP - ligamento periodontal; CA - cimento acelular; H - hialinização).

No lado distal das raízes, as fibras de Colagénio apresentaram-se mais organizadas que nos animais submetidos durante 24 horas à aplicação da força, mostrando uma orientação oblíqua e direcionando-se do osso alveolar para o cemento radicular em sentido apical (Figura 2.58). Neste lado do movimento, o ligamento apresentou uma morfologia próxima do normal, no entanto, na maior parte das secções e em toda a extensão do ligamento periodontal os vasos sanguíneos surgiram com um aspeto hiperémico.

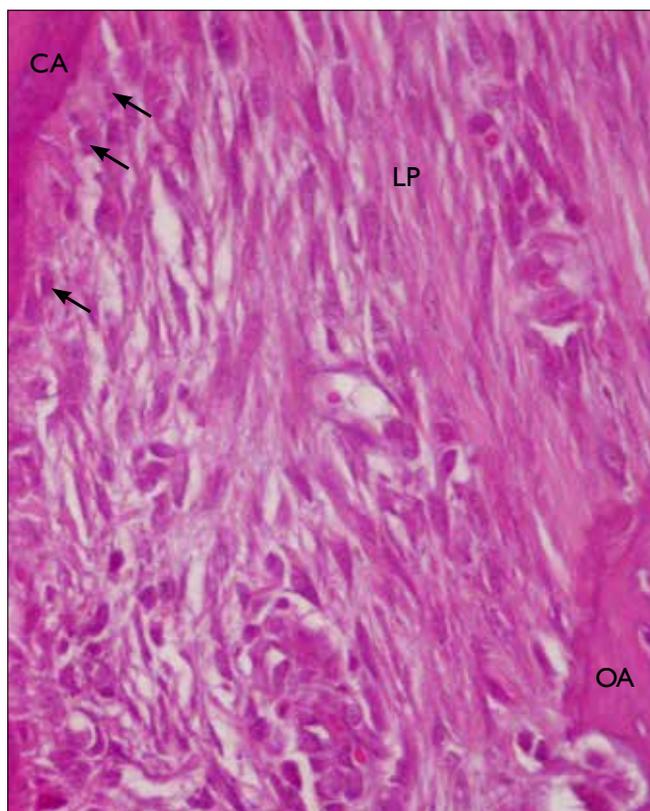


Figura 2.58 – Aspeto histológico do periodonto no lado de tensão onde é notória a neoformação de cemento bem como a camada de cementoblastos suprajacente (seta). De notar a orientação das fibras do ligamento periodontal em sentido apical do osso alveolar para o cemento radicular. H.E., x400 no original.  
(OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CA - cemento acelular).

No lado mesial, a reabsorção óssea direta continuou a não ser uniforme em todas as secções, sendo, no entanto, mais intensa do que no grupo anterior de 24 horas (Figura 2.59). Continuaram ainda visíveis em algumas secções processos de remodelação e reabsorção óssea a nível dos espaços endosteais típicos da fisiologia do animal utilizado. No lado distal das raízes de algumas secções analisadas continuaram a ser patentes fenómenos de reabsorção óssea direta. Mesmo nas secções onde não foram identificados osteoclastos, deve-se considerar o processo de remodelação como um mecanismo cíclico de reabsorção/formação, encontrando-se o registo deste fenómeno, traduzido por imensas linhas de reversão.

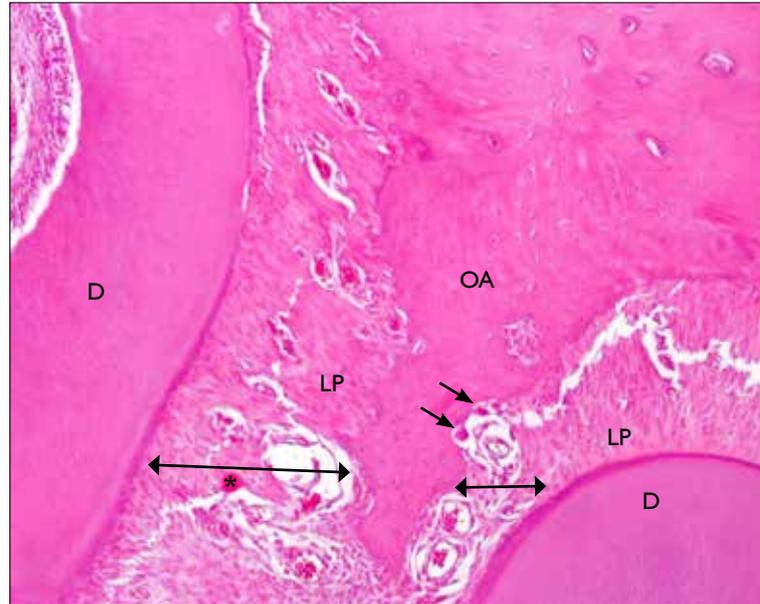


Figura 2.59 – Imagem histológica da região inter-radicular ilustrando a diminuição de espessura (setas duplas) do ligamento periodontal e a presença de osteoclastos (seta) no tecido ósseo alveolar; traduzindo a ocorrência de reabsorção óssea direta numa região que de acordo com Waldo e Rothblatt (1954) seria de tensão. No lado de tensão distal associado à raiz mesial de M1, salienta-se a ocorrência de uma ligeira hiper celularidade bem como a presença de pequenas áreas hemorrágicas (\*). H.E., x100 no original. (D - dente; LP - ligamento periodontal; OA - osso alveolar).

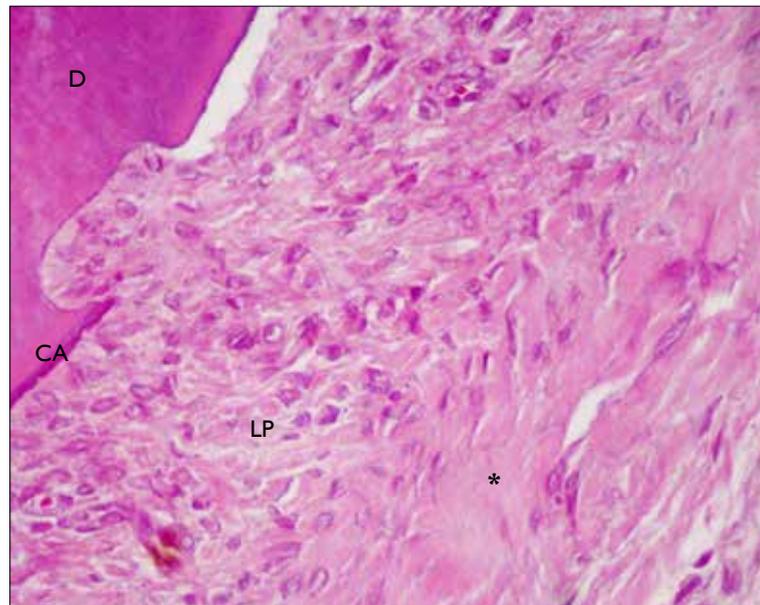


Figura 2.60 – Imagem histológica ilustrando a presença de uma área de reabsorção dentinária não reparada e evidente hiper celularidade do ligamento periodontal no lado de tensão. De salientar ainda um certo reforço fibroso (\*) do ligamento periodontal. H.E., x400 no original. (D - dentina; LP - ligamento periodontal; CA - cimento acelular).

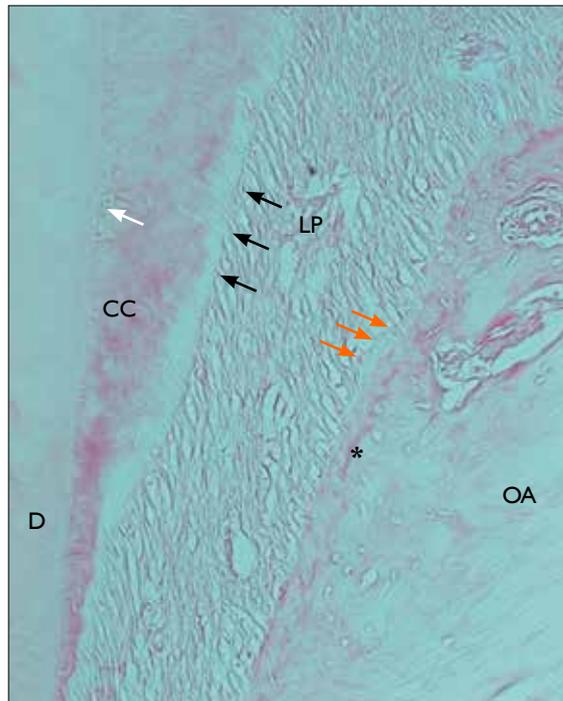


Figura 2.61 – Aspeto histológico do periodonto no lado de tensão, sendo visível a espessa camada de cimento celular, bem como alguns cementócitos (seta branca), e a presença de uma linha nítida de demarcação entre o tecido ósseo alveolar e o tecido ósseo recém-formado (\*). De notar a manutenção da integridade do ligamento periodontal e ainda da camada cementoblástica (seta preta) e osteoblástica (seta laranja) bem como das fibras de Sharpey. H.E., x200 no original.  
(D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CC - cimento celular).

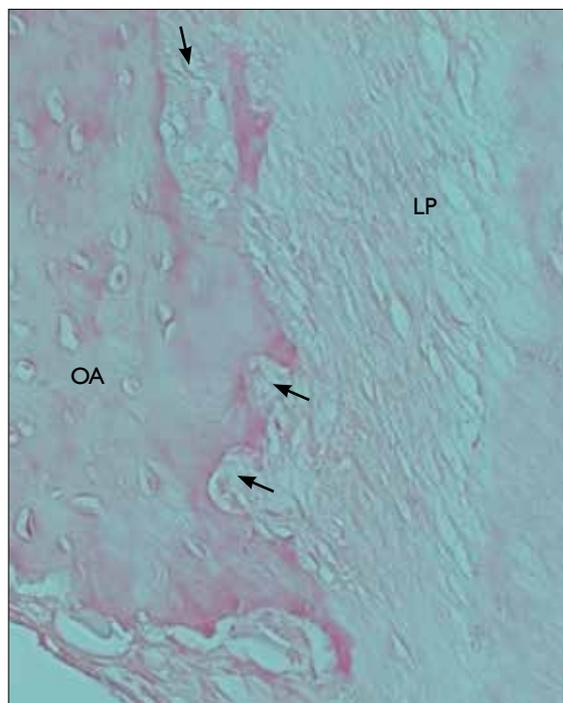


Figura 2.62 – Corte histológico do lado de pressão onde se observa, ao nível da parede óssea alveolar, a presença de uma superfície bastante irregular com típicas lacunas de Howship que caracterizam a ocorrência de processos ativos de reabsorção. H.E., x200 no original.  
(OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

Também neste grupo experimental, e no que se refere aos estudos por IHC, foi possível observar somente no lado de pressão do movimento, fibroblastos a expressarem tenuamente o TGF- $\beta$ . Além da expressão nos fibroblastos, continuaram a ser identificados alguns cementoblastos a expressarem este fator de crescimento. Porém, e tal como verificado nos grupos T01 e T02, também não foi possível detetar qualquer expressão do TGF- $\beta$ 1 nas células constituintes do tecido ósseo (Figura 2.63).

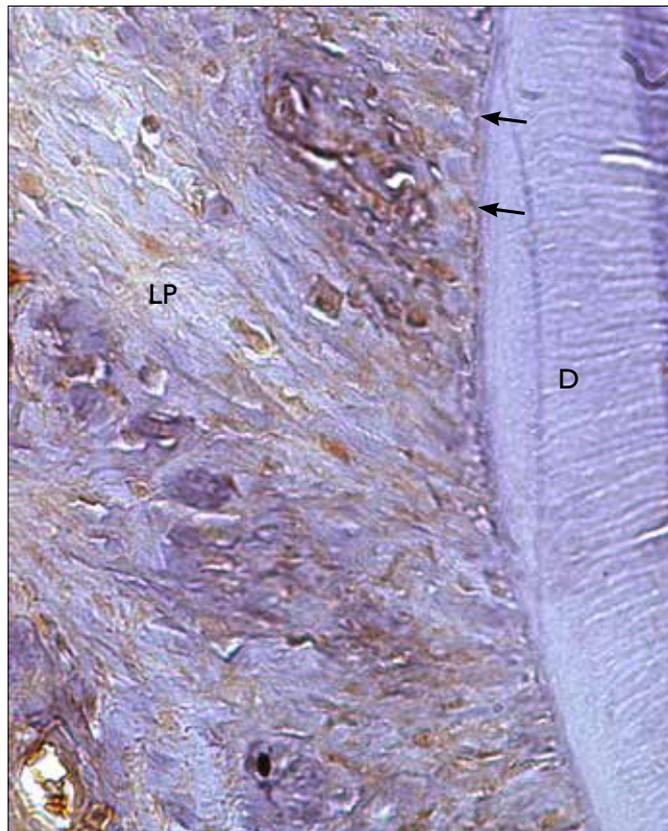


Figura 2.63 – Aspeto histológico do lado de pressão, sendo visíveis fibroblastos e alguns cementoblastos (seta) a expressarem tenuamente TGF- $\beta$ 1. x400 no original. (D - dente; LP - ligamento periodontal).

Neste grupo, os fibroblastos presentes em todo o ligamento periodontal, tanto no lado de pressão como no lado de tensão, continuaram a expressar intensamente Smad2. Foi igualmente visível a expressão da Smad2, apesar de uma forma mais ténue, nas células perivasculares mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos. Foi ainda possível identificar, tanto no lado de pressão como no de tensão, a intensa expressão da Smad2 nos cementoblastos, bem como em algumas células constituintes do tecido ósseo, nomeadamente, nos osteócitos (Figuras 2.64 a 2.66).

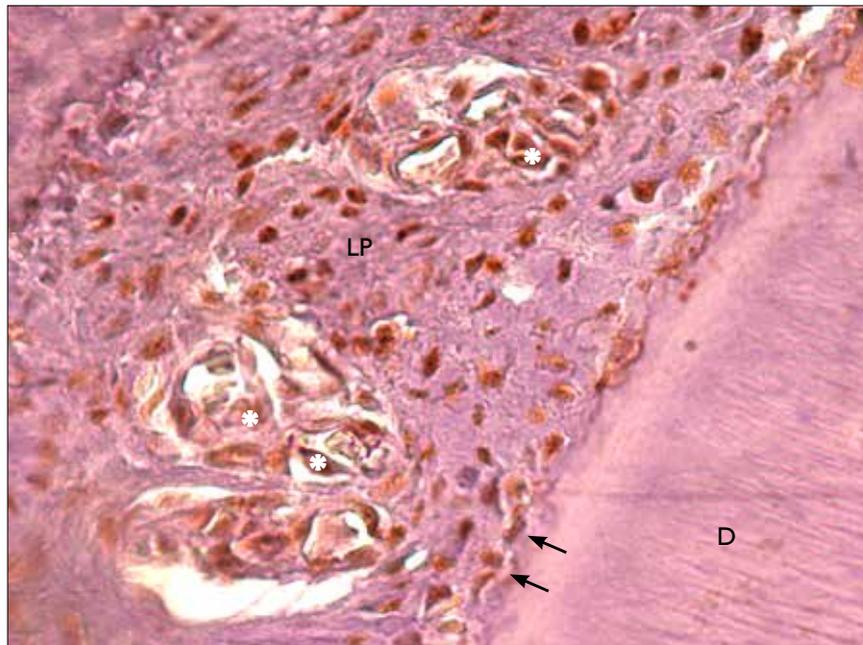


Figura 2.64 – Imagem histológica do lado de pressão, na qual são visíveis fibroblastos, células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (\*) e cementoblastos (seta) a expressarem Smad2. x400 no original. (D - dente; LP - ligamento periodontal).

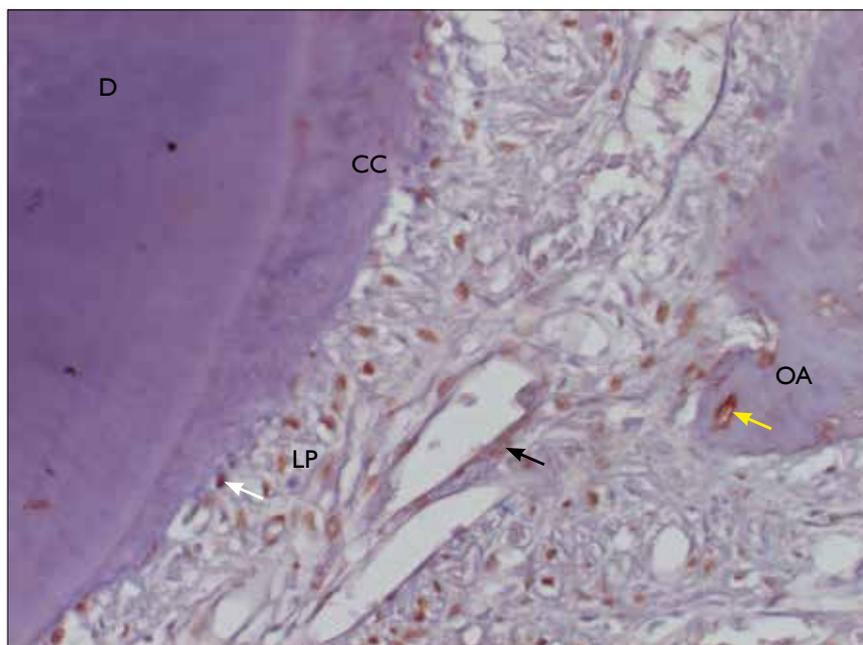


Figura 2.65 – Imagem histológica do periodonto da zona de tensão, na qual são visíveis fibroblastos, osteócitos (seta amarela) e cementoblastos (seta branca) a expressarem Smad2. De salientar a presença de células perivasculares células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta preta) também a expressarem com menos intensidade Smad2. x100 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CC - cimento celular).

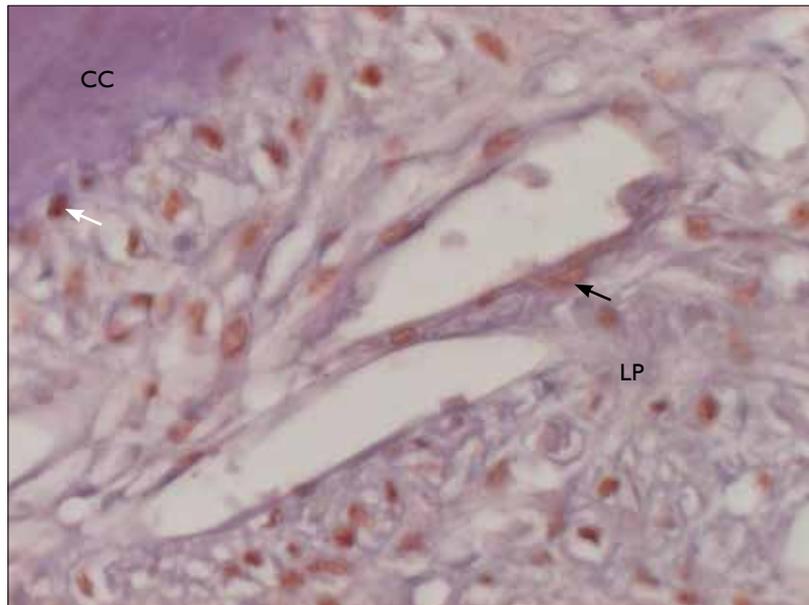


Figura 2.66 – Maior ampliação da imagem anterior mostrando os fibroblastos, cementoblastos (seta branca) e péricitos/células mesenquimatosas indiferenciadas (seta preta) a expressarem intensamente Smad2. H.E., x400 no original. (D - dentina; LP - ligamento periodontal; CA - cemento acelarar).

Tal como nos grupos anteriores, a marcação para a Smad3 continuou a não ser positiva em qualquer população celular constituinte do periodonto.

Neste grupo experimental, tanto no lado de pressão como no lado de tensão, continuou a ser observada a expressão moderada nos fibroblastos para a IL-10. No entanto, cementoblastos, cementócitos, células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos, osteoblastos e osteócitos expressaram de forma mais intensa a IL-10 (Figuras 2.67 a 2.69).

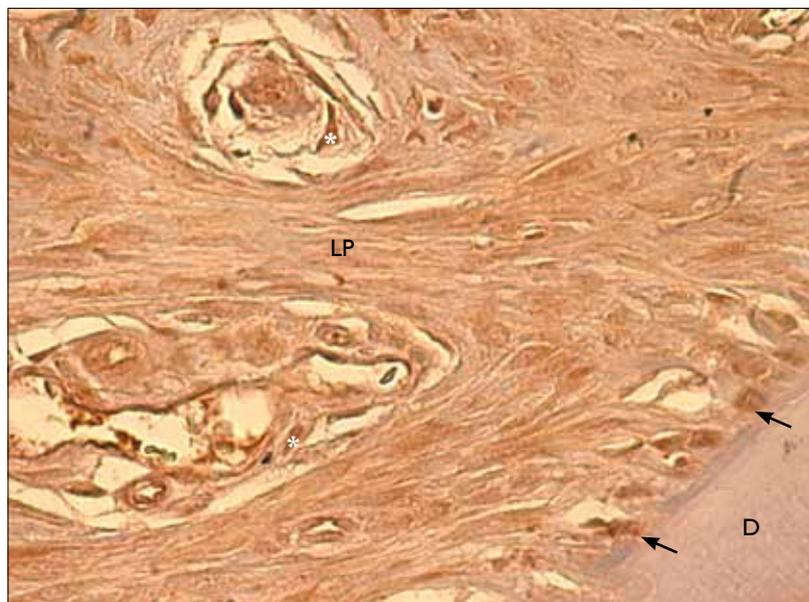


Figura 2.67 – Imagem histológica do lado de pressão, na qual estão presentes fibroblastos a expressarem IL-10. Estão também presentes cementoblastos (seta) e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta) a expressarem mais intensamente a IL-10. x400 no original. (D - dente; LP - ligamento periodontal).

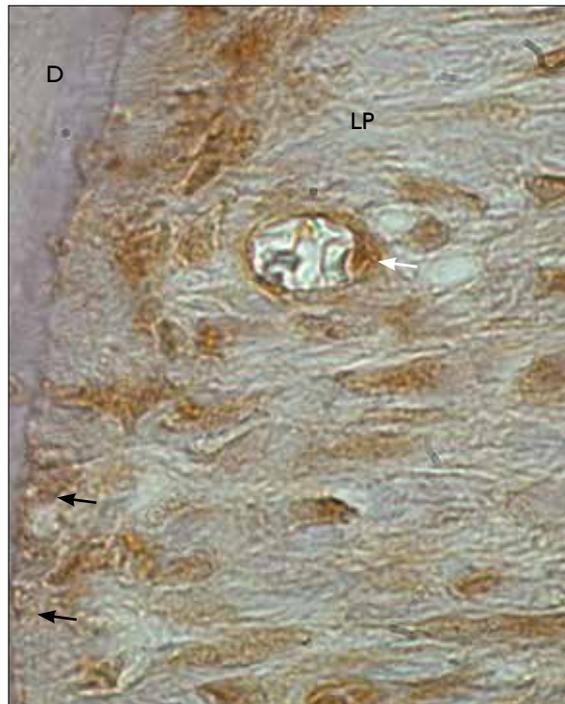


Figura 2.68 – Imagem histológica do lado de tensão, na qual estão presentes fibroblastos, cementoblastos (seta preta) e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta branca) a expressarem IL-10. x400 no original.  
(D - dente; LP - ligamento periodontal).

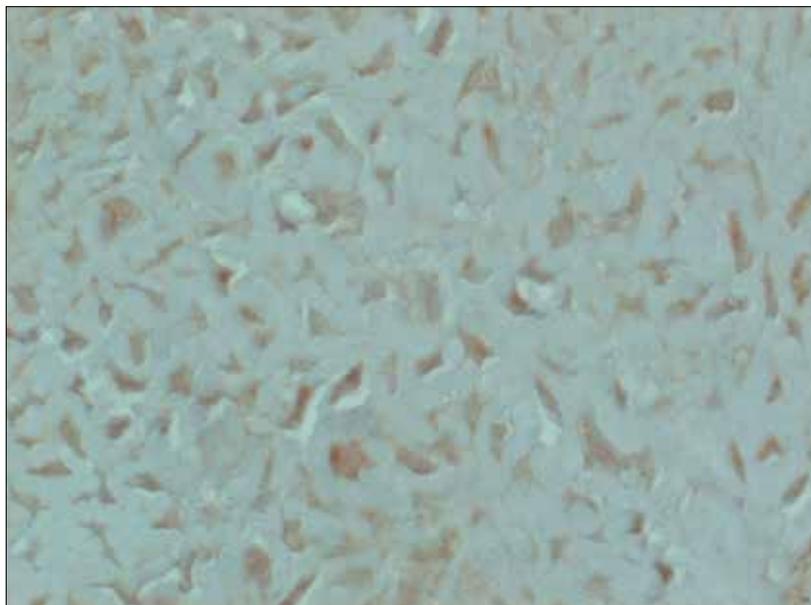


Figura 2.69 – Imagem histológica do ligamento periodontal, na qual são visíveis fibroblastos com uma expressão mais moderada da IL-10. x400 no original.

Também a  $\alpha$ -Sma, tal como nos grupos anteriores, continuou a não apresentar marcação positiva pelas populações celulares do periodonto analisado, exceto em células da musculatura lisa constituintes da parede de alguns dos vasos sanguíneos aqui presentes.

A detecção por IHC do PCNA revelou uma intensa positividade de marcação nas células constituintes do periodonto, principalmente nos fibroblastos e cementoblastos-like. Ambas as populações celulares expressaram a proteína com uma intensidade muito semelhante em ambos os lados do movimento dentário (Figuras 2.70 a 2.72).

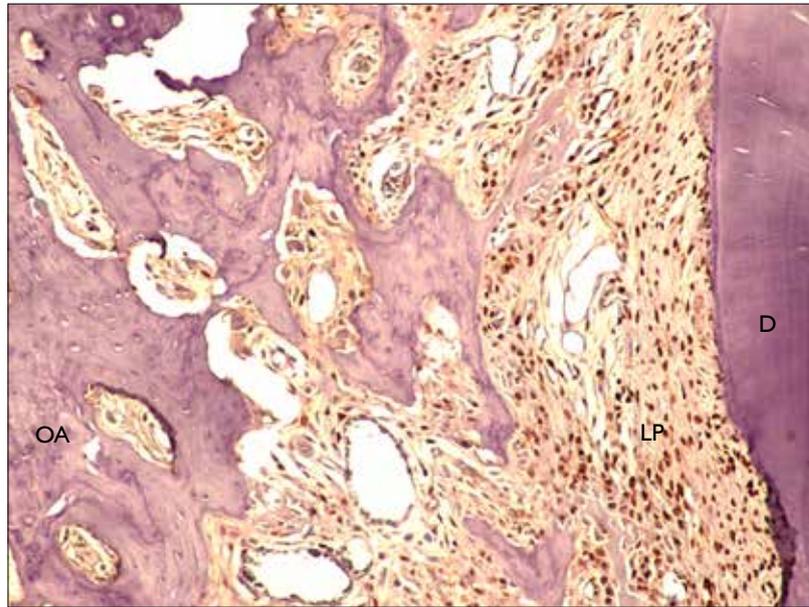


Figura 2.70 – Aspeto histológico do periodonto do lado de pressão, sendo visível a expressão do PCNA. x100 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

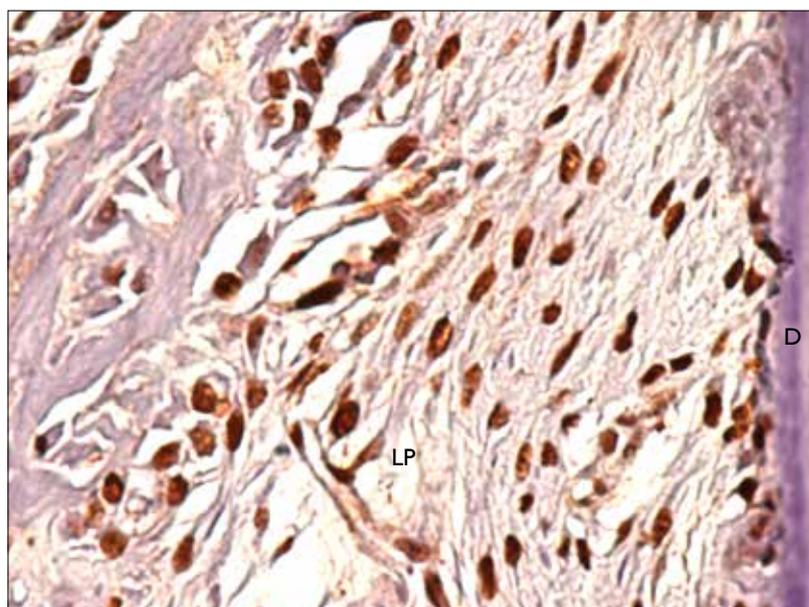


Figura 2.71 – Maior ampliação da imagem anterior na qual é visível a expressão nas células do ligamento periodontal do PCNA. x400 no original. (D - dentina; LP - ligamento periodontal).

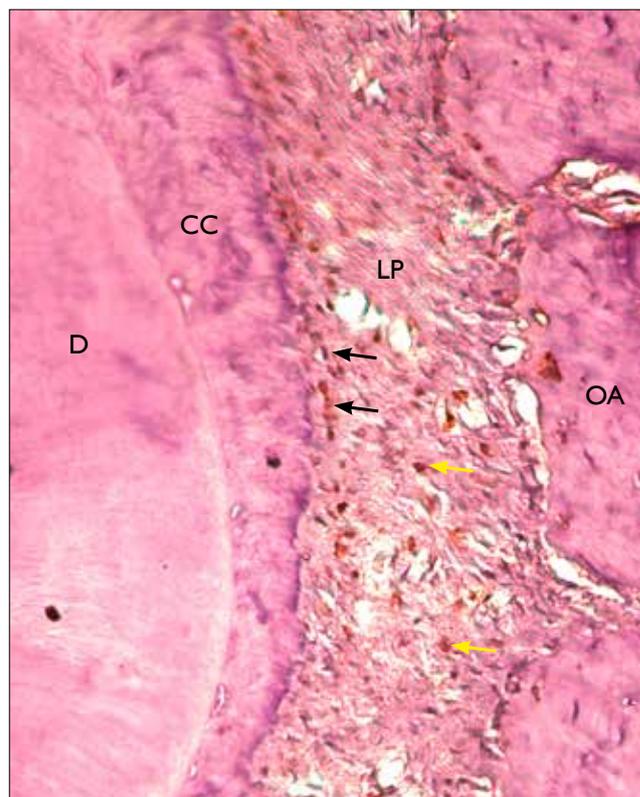


Figura 2.72 – Imagem histológica representativa do periodonto do lado de tensão na qual são visíveis células a expressarem PCNA, nomeadamente cementoblastos-like (seta preta) e fibroblastos (seta amarela). x400 no original.

(D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CC - cimento celular).

#### 2.2.4. Grupo T03 - Fase ativa com manipulação, elastómero mantido durante 72 horas

À semelhança do grupo anterior, também neste grupo experimental, a característica mais importante observada foi a proliferação mesenquimatosa ao longo de todo o ligamento periodontal, detetada sobre a forma de hiper celularidade, exceto nas áreas onde ocorreu hialinização. No lado mesial do ligamento periodontal sujeito a forças de pressão continuaram a ser observadas zonas discretas de hialinização associadas à superfície radicular. No lado distal, apesar de se notar também uma certa hiper celularidade, o ligamento apresentou-se com o seu aspeto típico.

Foi ainda de registar a observação de fenómenos de angiogénese, sob a forma de microvasos, principalmente junto à superfície alveolar indiciando, de facto, a elevada taxa metabólica do tecido ósseo e a grande proximidade entre os fenómenos de angiogénese e de modelação/remodelação do tecido ósseo alveolar. De salientar ainda que em algumas secções, quer do lado de mesial quer do lado distal das raízes do 1º molar maxilar, os vasos sanguíneos surgiram com um aspeto hiperémico (Figuras 2.73 e 2.74).



Figura 2.73 – Imagem histológica da raiz mesial de M1, onde se observa proliferação mesenquimatosa ao longo de todo o ligamento periodontal analisado. A angiogénese presente, visível sobre a forma de microvasos (seta preta) observa-se junto à parede alveolar. Observam-se também lacunas de reabsorção óssea direta (\*) na parede alveolar sujeita a compressão que têm muito próximo linhas de reversão (seta branca) características da remodelação que está a ocorrer. H.E., x40 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CC - cimento celular; P - polpa).



Figura 2.74 – Imagem histológica mostrando o lado distal da mesma raiz mesial de M1, correspondente ao lado de tensão, onde também é visível proliferação mesenquimatosa detetada sob a forma de hipercelularidade. De salientar a existência de fenómenos de reabsorção/remodelação na parede alveolar distal (seta preta). Também se observam vasos hiperémicos, principalmente adjacentes à parede alveolar, fenómeno típico da remodelação que aqui está a ocorrer. H.E., x40 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CC - cimento celular; P - polpa).

Em algumas secções foram visíveis, no lado mesial das raízes de MI, pequenas áreas de reabsorção radicular que se encontravam, no entanto, já preenchidas por cimento celular. Contudo no lado distal, que estava sujeito à atuação de forças de tensão, foram frequentemente observados fenômenos intensos de remodelação do cimento celular (Figuras 2.75. e 2.76).

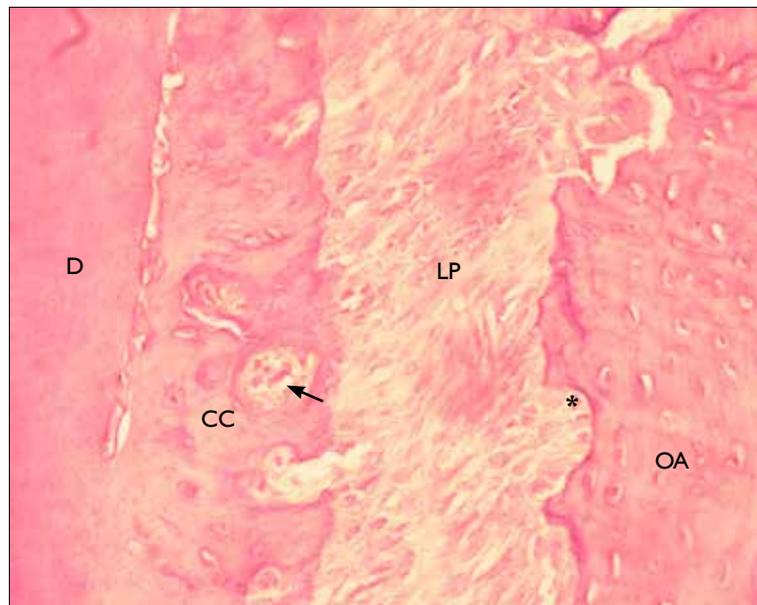


Figura 2.75 – Imagem histológica ilustrativa dos constituintes do periodonto no lado de tensão. De salientar a presença de osteoclastos (\*), traduzindo a ocorrência de fenômenos de reabsorção do tecido ósseo alveolar, bem como a existência de processos de remodelação no cimento celular. O ligamento periodontal apresenta-se conservado. H.E., x200 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CC - cimento celular).

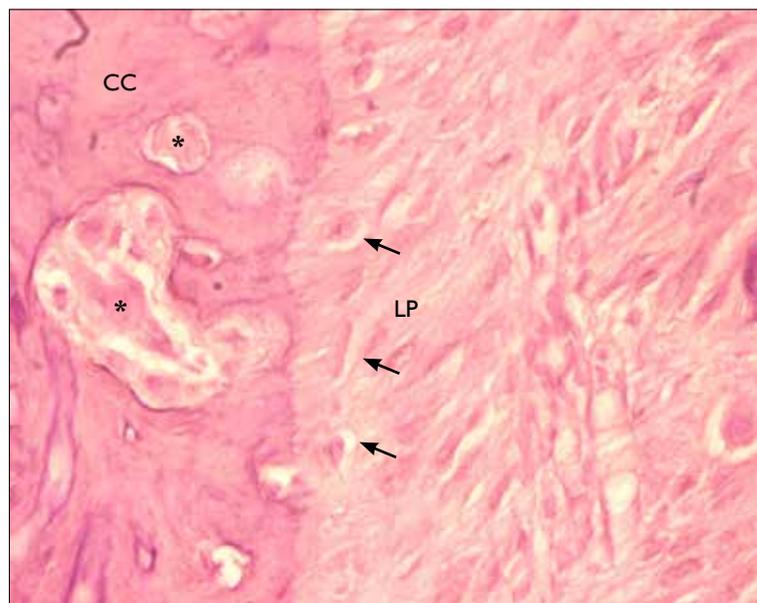


Figura 2.76 – Corte histológico ilustrando os fenômenos de remodelação no cimento celular. São visíveis células com características de cementoclastos (\*) e imediatamente adjacentes cementoblastos (seta) em paliçada num processo ativo de síntese. H.E., x200 no original. (LP - ligamento periodontal; CC - cimento celular).

Há que salientar, com particular relevância, que foram encontradas imagens sugestivas de restos epiteliais de Malassez em algumas zonas do ligamento periodontal, principalmente na região inter-radicular (Figura 2.77).

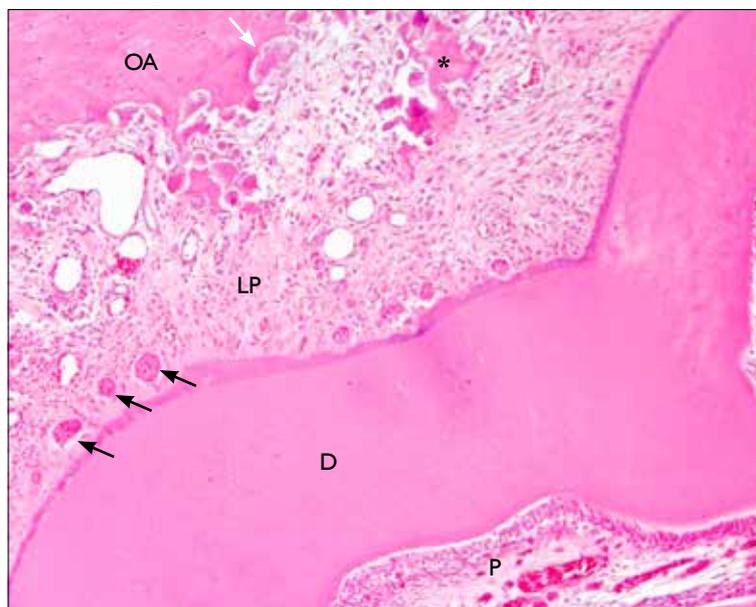


Figura 2.77 – Imagem histológica da região inter-radicular das raízes mesial e distal de M1. Observa-se reabsorção óssea direta, bem como a presença de numerosos osteoclastos (seta branca) alojados nas suas lacunas. De registar ainda a existência de inúmeros restos epiteliais de Malassez (seta preta) distribuídos no ligamento periodontal adjacente ao cimento. É de assinalar também a presença de ossificação intramembranosa (\*). H.E., x100 no original. (D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; P - polpa).

No lado mesial das raízes de M1 continuou a ser possível identificar a ocorrência de fenómenos de reabsorção óssea direta da superfície alveolar, numa magnitude similar à do grupo anterior (Figura 2.78). De referir, no entanto, a presença, na superfície mesial do septo inter-radicular, região do tecido ósseo alveolar associado à zona de aplicação da força de tensão, a presença de algumas imagens sugestivas de fenómenos osteoclásticos, como seja a superfície irregular e festoneada do tecido ósseo alveolar (Figuras 2.79 e 280). Porém, e de acordo com o esperado para as regiões submetidas a forças de tensão, foi possível observar flagrantes fenómenos de aposição óssea, com a presença do aspecto típico dos osteoblastos em paliçada ao longo da superfície óssea alveolar (Figura 2.81).

Apesar da reabsorção óssea presente em ambos os lados analisados, verificou-se um aumento das linhas de reversão, mesmo em zonas associadas aos espaços endosteais (Figura 2.79). Particularmente no lado mesial, estas linhas de reversão surgiram intimamente associadas a áreas de reabsorção óssea direta, evidenciando a intensa atividade de remodelação característica do tecido ósseo, altamente dinâmico (Figura 2.78).

De referir também a presença, em algumas secções, de um certo estímulo osteogénico observado na face mesial, correspondente ao lado sujeito a forças de pressão. Convém salientar que a maioria deste tecido ósseo é constituído por delgadas trabéculas ósseas, bastante imaturas, resultantes de um processo de ossificação intramembranosa. De facto, a ocorrência de fenómenos de ossificação intramembranosa demonstra a tentativa de remodelação do osso alveolar como resposta à agressão constituída pela força de pressão (Figura 2.84).

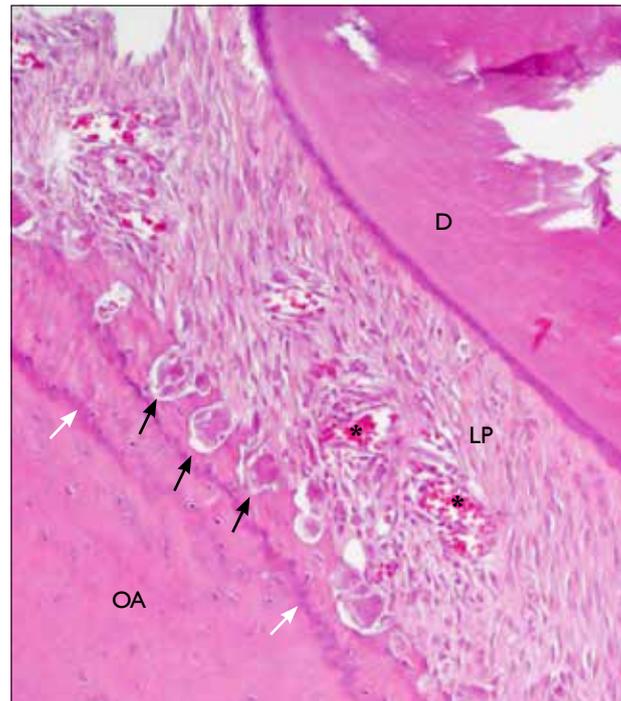


Figura 2.78 – Corte histológico do lado mesial da raiz mesial de M1, onde são visíveis osteoclastos presentes em lacunas de reabsorção óssea direta (seta preta). São visíveis também linhas de reversão (seta branca) em toda a extensão da parede do osso alveolar e vaso sanguíneos hiperêmicos (\*), fenômenos típicos da remodelação que está a ocorrer. H.E., x100 no original. (D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

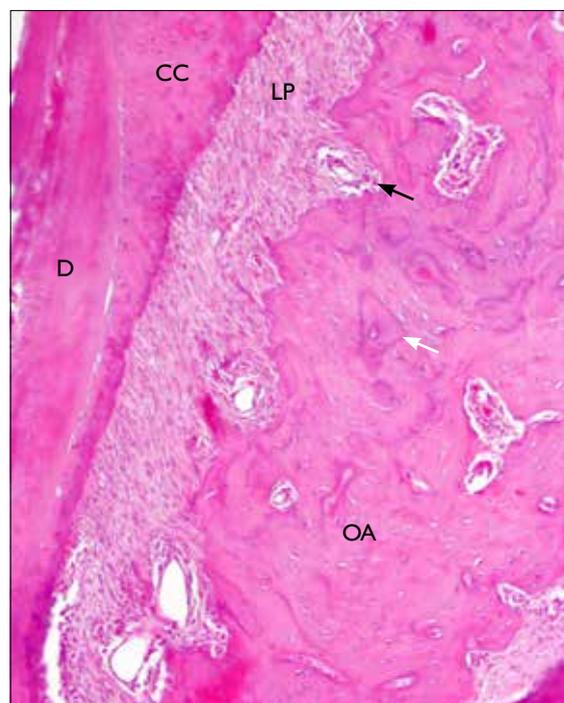


Figura 2.79 – Corte histológico ilustrando o septo ósseo inter-radicular, onde são visíveis osteoclastos contidos nas suas lacunas (seta preta), sendo notória a presença de linhas de reversão (seta branca), indiciando fenômenos típicos da remodelação que aqui está a ocorrer. É também visível, neste lado do ligamento, hipercelularidade indicando proliferação mesenquimatosa. H.E., x100 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CC - cimento celular).

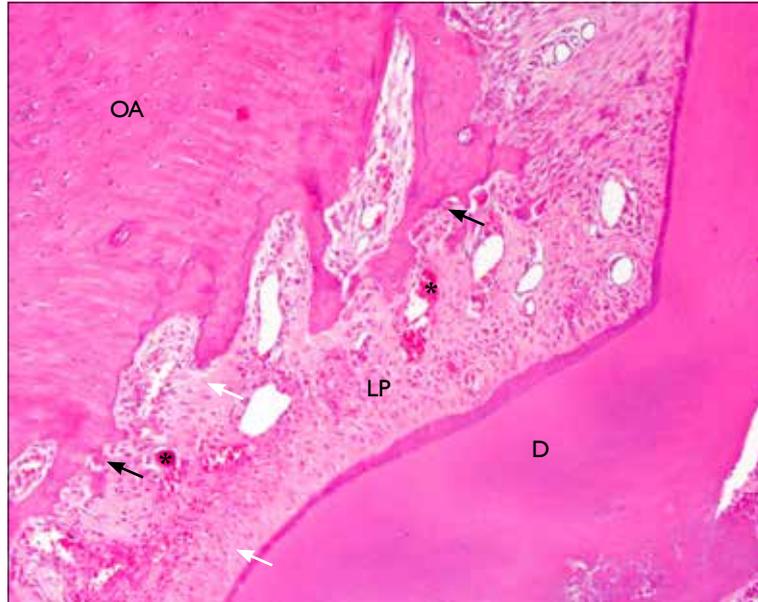


Figura 2.80 – Imagem histológica da região inter-radicular das raízes mesial e distal de M1, onde são visíveis os fenômenos de remodelação óssea como a presença de osteoclastos (seta preta) e o aumento de vascularização (\*) adjacente à parede alveolar. São também visíveis áreas de hialinização (seta branca) junto à superfície radicular. H.E., x100 no original. (D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).



Figura 2.81 – Corte histológico ao nível do septo interdentário, sendo visível a raiz mesial de M1. Observa-se nitidamente a ocorrência de processos de neoformação óssea com os osteoblastos dispostos em paliçada (seta preta) sobre o tecido ósseo no lado de tensão. De registrar também, no lado de compressão da raiz distal (\*), a fase de reversão e síntese após intensa reabsorção. H.E., x400 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CC - cimento celular).

Tal como nos grupos experimentais anteriores, a detecção por IHC do TGF- $\beta$ 1 permitiu observar a sua expressão ténue nos fibroblastos do ligamento periodontal bem como em células com fenótipo osteoblástico ou osteoblasto-like, apenas no lado do movimento sujeito a forças de pressão. Já junto à superfície radicular, foi de destacar a reação IHC para o TGF- $\beta$ 1 nos cementoblastos (Figuras 2.82 e 2.83).

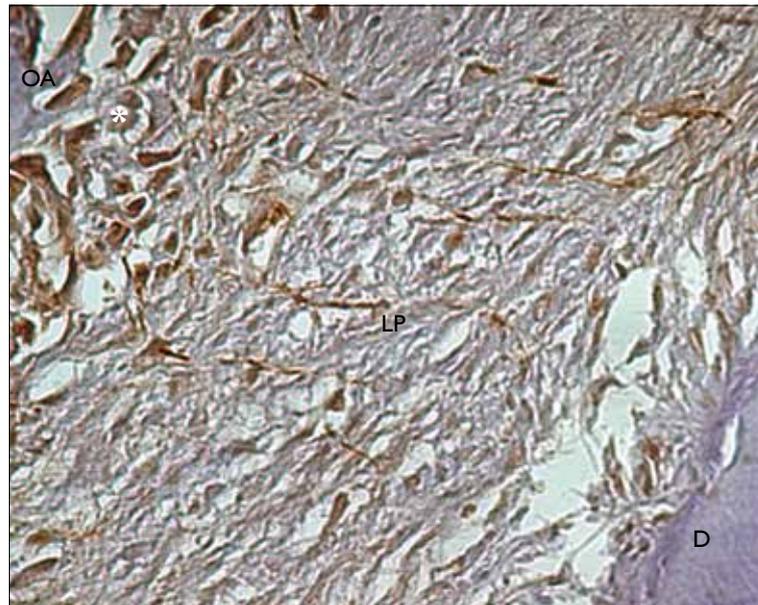


Figura 2.82 – Corte histológico do lado de pressão, no qual está patente a expressão do TGF- $\beta$ 1 particularmente junto à parede alveolar em células com fenótipo de osteoblasto ou osteoblasto-like (\*). x400 no original. (D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).



Figura 2.83 – Imagem histológica na qual são visíveis cementoblastos a expressarem TGF- $\beta$ 1 junto à superfície radicular. x1000 no original. (D - dente; LP - ligamento periodontal).

No que diz respeito à Smad2, foi possível observar uma expressão intensa nos fibroblastos, osteoblastos, osteócitos, cementoblastos e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos, em ambos os lados do movimento. Contudo, essa expressão não foi uniforme, dado que em ambos os lados do movimento, ela não

foi tão acentuada nos fibroblastos e nos cementoblastos como nos osteoblastos, (Figuras 2.84 e 2.85). No lado de tensão, também os fibroblastos surgiram com uma expressão mais ténue para a Smad2 que os osteoblastos, estando, no entanto, presentes poucas destas células ósseas com forte marcação no núcleo. (Figuras 2.84 e 2.86).

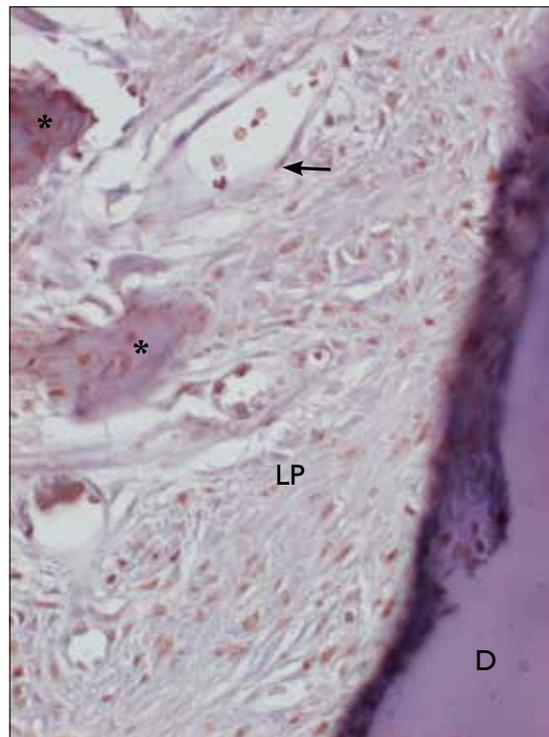


Figura 2.84 – Aspeto histológico do lado de pressão do movimento, mostrando fibroblastos e osteoblastos a expressarem Smad2. É visível a presença de células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos perivasculares (seta) marcadas mais tenuamente. Também se observa ossificação intramembranosa (\*). x100 no original. (D - dente; LP - ligamento periodontal).

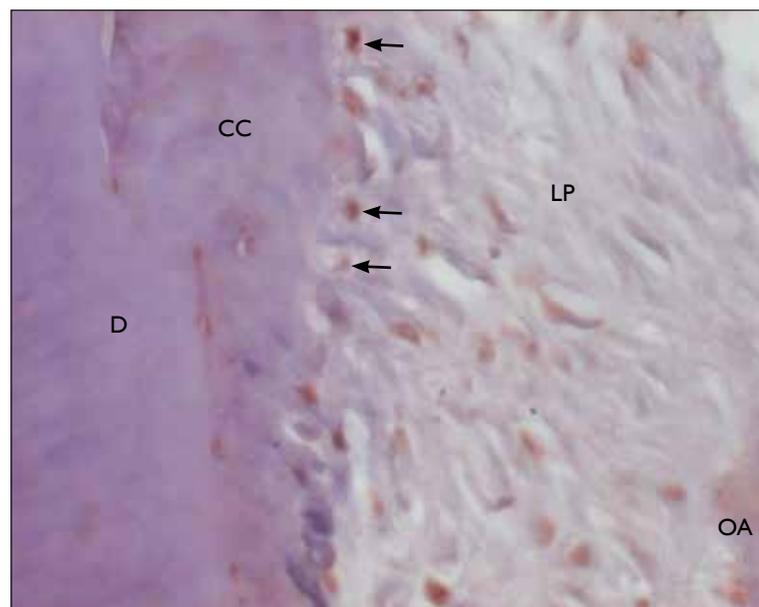


Figura 2.85 – Corte histológico do lado de tensão, onde se vêem fibroblastos, cementoblastos (seta) e osteócitos a expressarem Smad2. x100 no original. (D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CC - cimento celular).

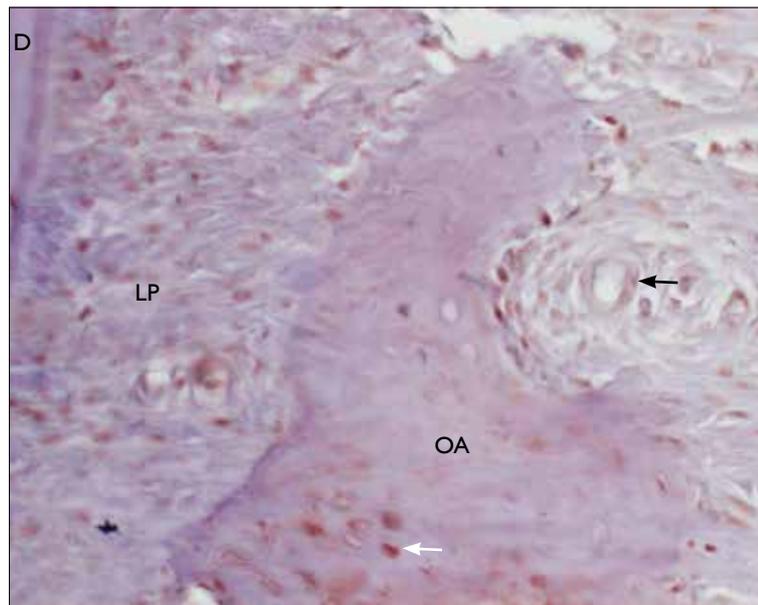


Figura 2.86 – Aspecto histológico da região do septo ósseo interdentário entre M1 e M2 e ligamento periodontal, evidenciando a expressão da Smad2, tanto no lado de tensão mesial como no lado de pressão distal. Os fibroblastos apresentam-se marcados ao longo de todo o ligamento, sendo visíveis osteócitos com forte marcação no núcleo (seta branca). É visível também a presença de células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos a marcar tenuamente para a Smad2 (seta preta). x400 no original.  
(D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

Tal como no grupos anteriores não houve imunorreatividade para a Smad3 em nenhuma das populações celulares presentes no ligamento periodontal (Figura 2.87).

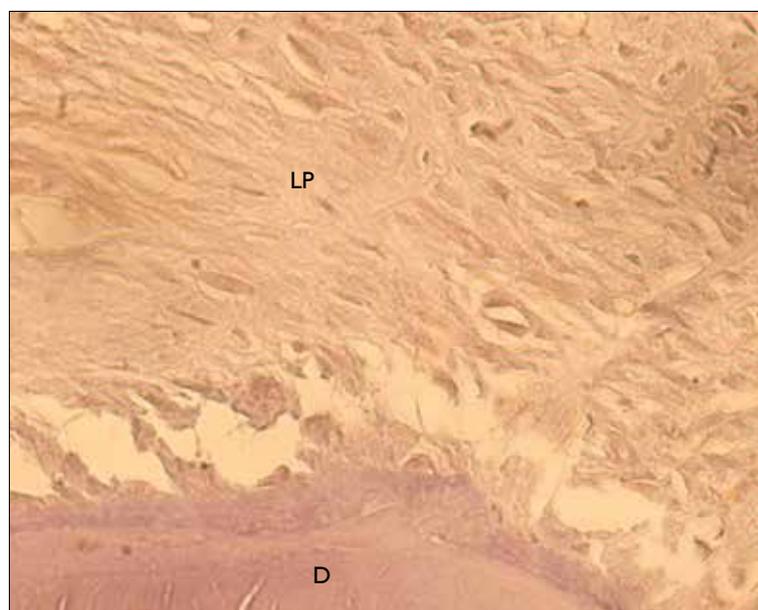


Figura 2.87 – Imagem histológica ilustrando a ausência de expressão Smad3. x400 no original.  
(D - dente; LP - ligamento periodontal).

Em ambos os lados do movimento, a reação IHC para a IL-10 foi mais intensa nas populações celulares adjacentes à superfície alveolar, sendo de notal a diminuição da sua expressão à medida que há deslocamento para a área do ligamento periodontal adjacente à superfície radicular. Convém referir que a hiper-reatividade

para a IL-10 no tecido periodontal adjacente à superfície alveolar, estará relacionada com a proliferação de osteoblastos associada quer à ossificação intramembranosa com o respetiva formação de trabeculado ósseo, quer à remodelação do tecido ósseo que neste lado ocorreu (Figuras 2.88 e 2.89). Também foram observadas, tal como no grupo anterior, algumas células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos a expressarem IL-10. De registar a imunomarcação positiva para a IL-10 presente nos cementoblastos e fibroblastos, bem como nas células endoteliais, nas quais foi notória a localização preferencial no núcleo, da marcação para esta citocina.



Figura 2.88 – Imagem histológica do lado de pressão, onde é visível a expressão mais intensa da IL-10 no tecido ósseo alveolar, mostrando também a forte remodelação que aqui está a ocorrer. x400 no original. (D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

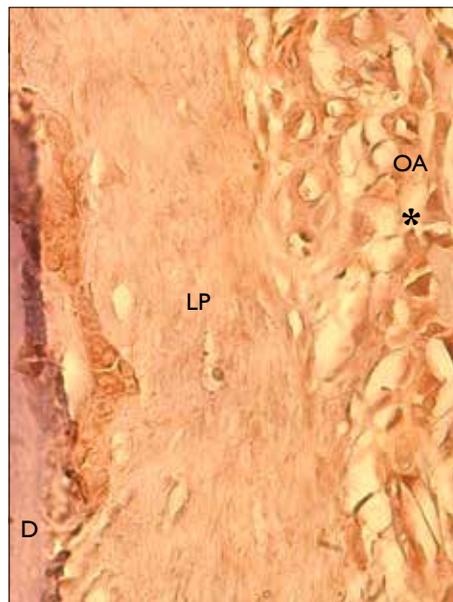


Figura 2.89 – Aspeto histológico do lado de tensão, mostrando a intensa expressão da IL-10 no tecido ósseo alveolar, área onde também está a ocorrer uma remodelação acentuada (\*). De notar que a expressão mais intensa da citocina se observa nos osteoblastos e osteócitos e, eventualmente, nas células mesenquimatosas indiferenciadas que se encontram num processo de diferenciação em osteoblastos. x400 no original.

(D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

Também neste grupo experimental, com a utilização dos anticorpos  $\alpha$ -Sma foi possível observar marcação nas células de músculo liso presentes em metarteríolas. Há que salientar, com particular relevância, que neste grupo experimental já se observou uma reação IHC positiva em algumas das células do ligamento periodontal, pelo que se presume que nesta altura estejam presentes no ligamento células com fenótipo de miofibroblastos (Figura 2.90).



Figura 2.90 – Aspeto histológico do ligamento periodontal mostrando células com fenótipo de miofibroblastos (seta) e células da parede vascular a expressarem IL-10. x1000 no original.

Relativamente ao PCNA, foi neste grupo experimental que a imunomarcação para a proteína foi mais intensa ao longo de todo o periodonto, principalmente no lado de pressão. De facto, é notória a positividade da marcação, bem como a sua distribuição ubíqua nas células do ligamento periodontal no lado sujeito a forças de pressão (Figura 2.91). Porém, no lado sujeito a forças de tensão foi observada uma menor quantidade relativa de células a expressarem PCNA (Figura 2.92).

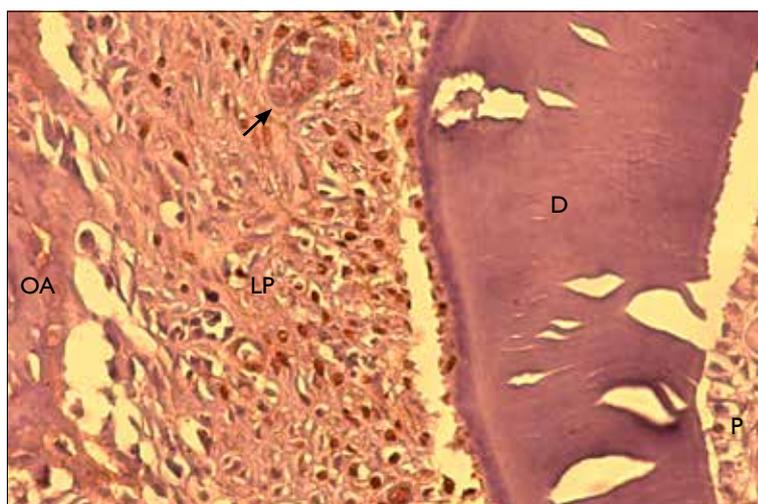


Figura 2.91 – Aspeto histológico do ligamento periodontal no lado de pressão, onde se observam células ligamentares a expressarem PCNA. De salientar a presença de uma imagem sugestiva de resto epitelial de Malassez (seta). x200 no original (D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; P - polpa).

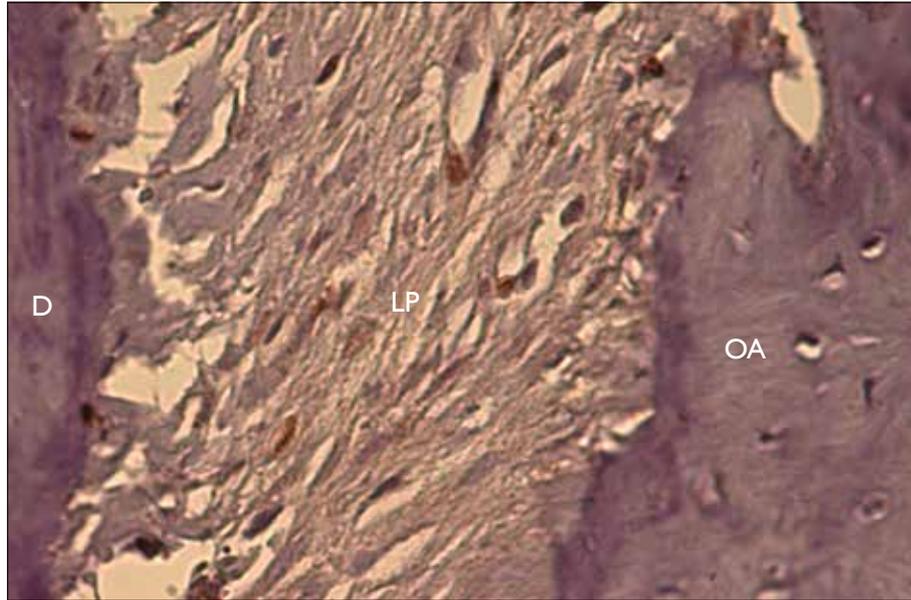


Figura 2.92 – Aspeto histológico do ligamento periodontal no lado de tensão. De registrar a diferença quer na intensidade da marcação quer na densidade de células a expressarem PCNA relativamente ao lado de pressão ilustrado na figura anterior. x400 no original (D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

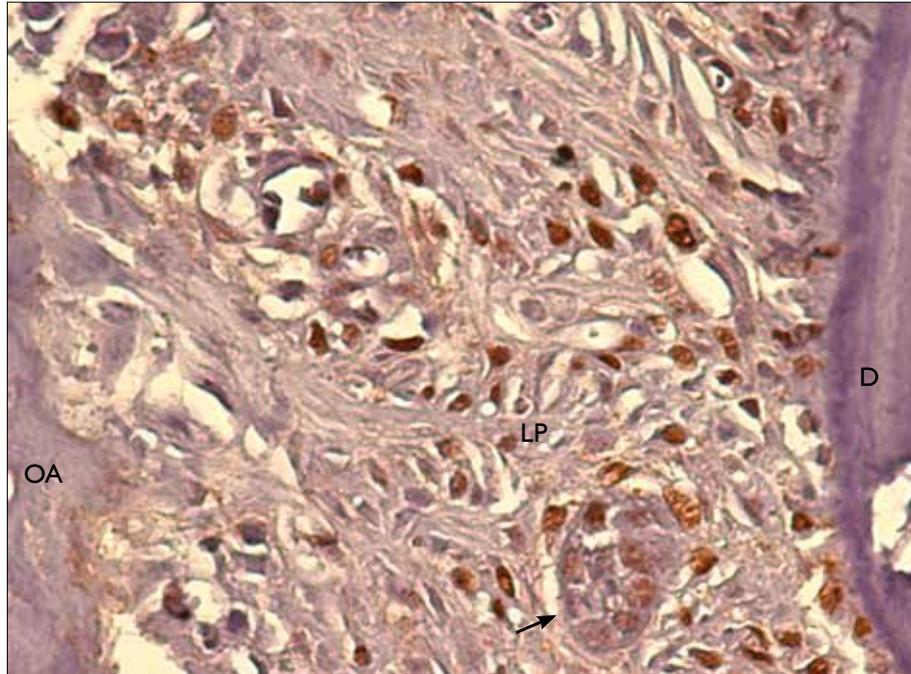


Figura 2.93 – Maior ampliação da Figura 2.91 na qual é visível, além de fibroblastos a expressarem PCNA, também uma imagem sugestiva de resto epitelial de Malassez. x400 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

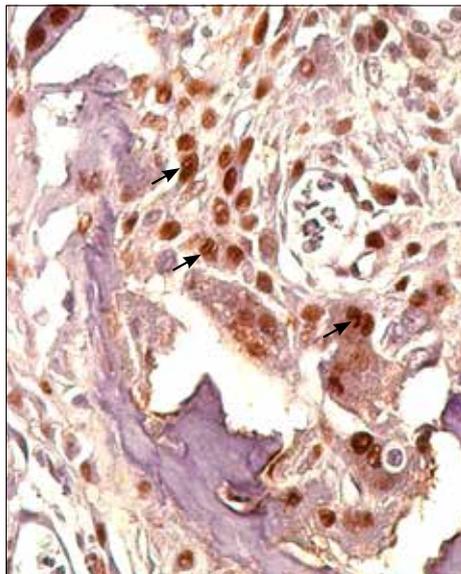


Figura 2.94 – Imagem histológica do ligamento periodontal, onde no mesênquima em regeneração são visíveis osteoclastos a expressarem PCNA, com a sua morfologia característica de células gigantes multinucleadas (seta). x400 no original.

### 2.2.5. Grupo T04 - Fase ativa com manipulação, elastómero mantido durante 96 horas

Neste grupo experimental e na maior parte das secções analisadas, não foram discerníveis alterações significativas quer no lado mesial quer no lado distal do ligamento periodontal, apresentando-se este com um aspeto muito semelhante ao do grupo controlo. Além disso, não foi perceptível também, na maioria dos casos, a ocorrência de fenómenos de reabsorção significativos quer do cemento radicular quer do osso alveolar, em ambos os lados do ligamento periodontal (Figura 2.95 a 2.99).

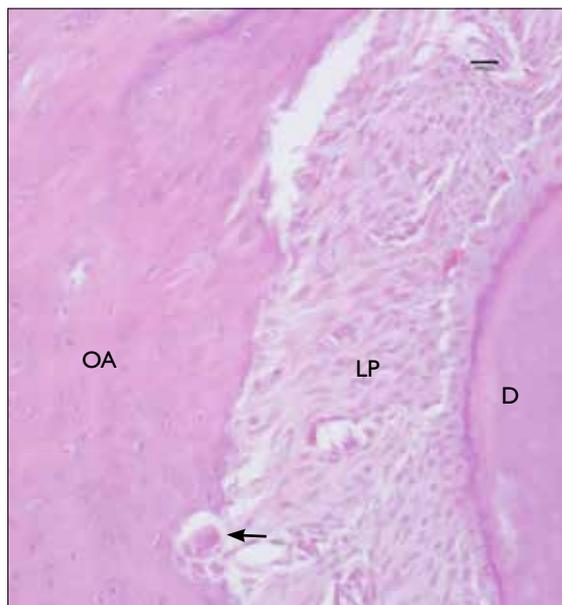


Figura 2.95 – Corte histológico do lado de pressão mesial da raiz mesial de M1, sendo visível o aspeto normalizado do ligamento periodontal com a característica orientação das fibras no sentido apical do osso alveolar para o cemento radicular. A parede alveolar apresenta também um aspeto normalizado, observando-se um osteoclasto (seta) no interior de uma lacuna de Howship. H.E., x200 no original.

(D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

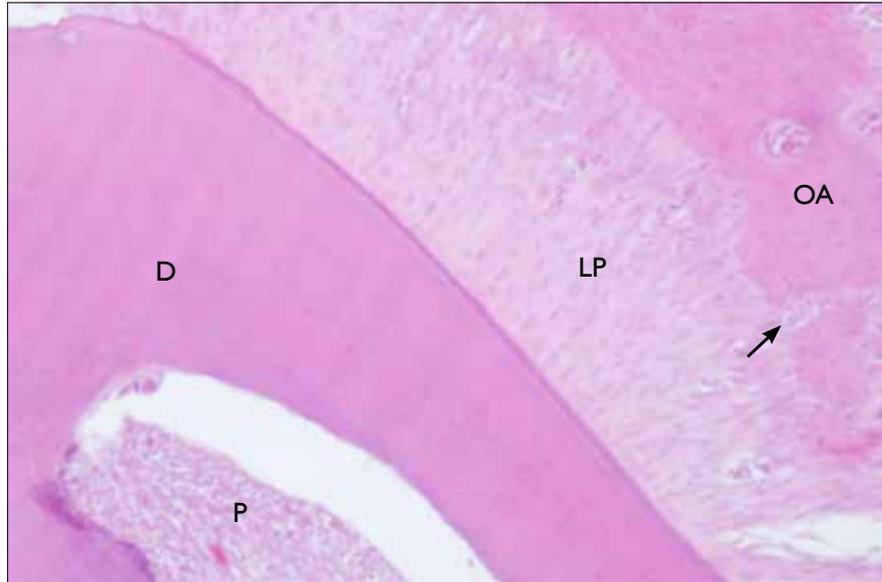


Figura 2.96 – Corte histológico do lado de tensão distal da raiz mesial de M1, surgindo o ligamento periodontal e a parede alveolar com um aspeto normalizado. É também visível a normal orientação no sentido apical das fibras periodontais desde o osso alveolar até ao cemento radicular. O cone de reabsorção visível na crista óssea corresponde a um fenómeno fisiológico normal presente neste animal experimental. H.E., x100 no original.  
(D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; P - polpa).



Figura 2.97 – Corte histológico correspondente a uma ampliação da imagem anterior, na qual é visível o aspeto normalizado do cemento, ligamento periodontal e superfície alveolar do lado de tensão. H.E., x200 no original.  
(D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

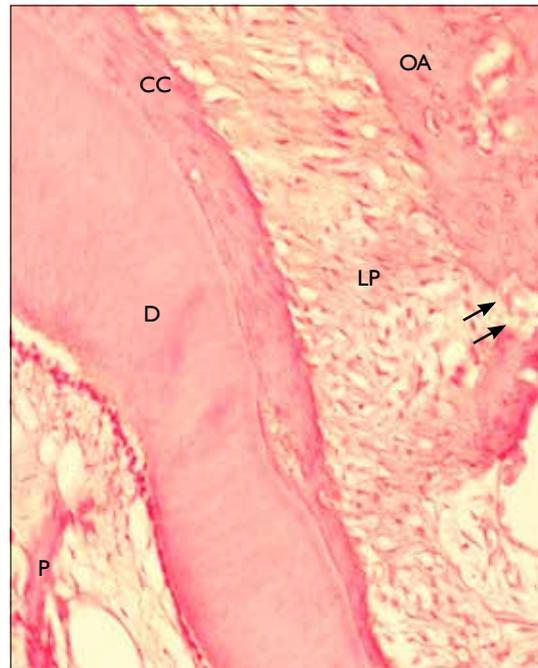


Figura 2.98 – Imagem histológica da face distal de tensão da raiz mesial de M1, sendo visível a reestruturação da anatomia do periodonto. O ligamento periodontal apresenta-se preservado com aspeto normal, tal como o cimento celular. São ainda notórias pequenas áreas de remodelação do tecido ósseo (seta). H.E., X200 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CC - cimento celular).

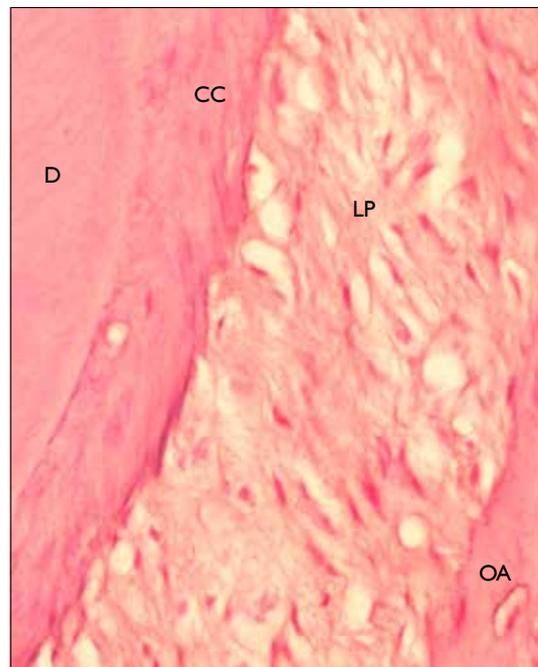


Figura 2.99 – Maior ampliação de uma área representada na figura anterior pondo em evidência a normal constituição do periodonto 96 horas após a remoção do estímulo, sendo evidente a remodelação que ocorreu nos tecidos periodontais. H.E., X400 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; CC - cimento celular).

No entanto, importa salientar que estas observações não foram uniformes em todas as secções, principalmente no que concerne às regiões sujeitas a forças de pressão. Em algumas secções foi possível observar a presença de zonas de reabsorção alveolar direta, sendo também visíveis, contudo, linhas de reversão

típicas que funcionam como marcas indeléveis na estrutura óssea traduzindo a intensa e constante remodelação que caracteriza este tecido. De registar que nalguns destes casos, foi possível observar ainda a presença de fenómenos de reabsorção radicular da superfície imediatamente oposta à parede alveolar em remodelação. Dado o elevado metabolismo desta região, não é de estranhar que, nestas zonas, o ligamento periodontal tenha surgido com um aspeto menos organizado (Figura 2.100 e 2.101).

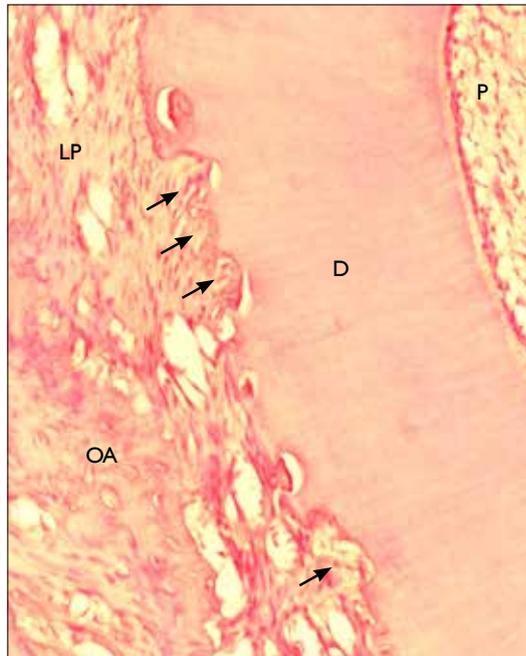


Figura 2.100 – Aspeto histológico da face mesial de compressão da raiz distal de M1. De registar a presença de várias lacunas de reabsorção (seta) na superfície radicular que atingem a dentina. H.E, x200 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; P - polpa).

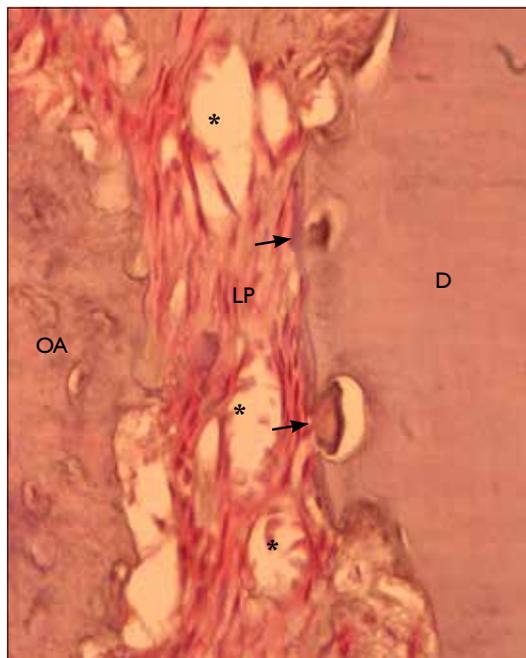


Figura 2.101 – Maior ampliação da imagem anterior onde são visíveis várias lacunas de reabsorção (seta) na superfície radicular que atingem a dentina. De salientar o aspeto desorganizado do ligamento periodontal e a presença de vasos sanguíneos (\*). H.E, x400 no original. (D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

É importante referir também que no lado de pressão, tal como no grupo anterior, foram observadas zonas de ossificação intramembranosa compatíveis com o extenso processo de reparação por regeneração que estava a ocorrer ao nível do tecido ósseo (Figura 2.102). Nas delgadas trabéculas ósseas é possível observar, para além da camada osteoblástica, uma grande densidade de osteócitos contidos nas suas lacunas arredondadas, características de um tecido ósseo imaturo. Os espaços entre estas trabéculas de formação recente estão ocupados por tecido conjuntivo laxo muito vascularizado.

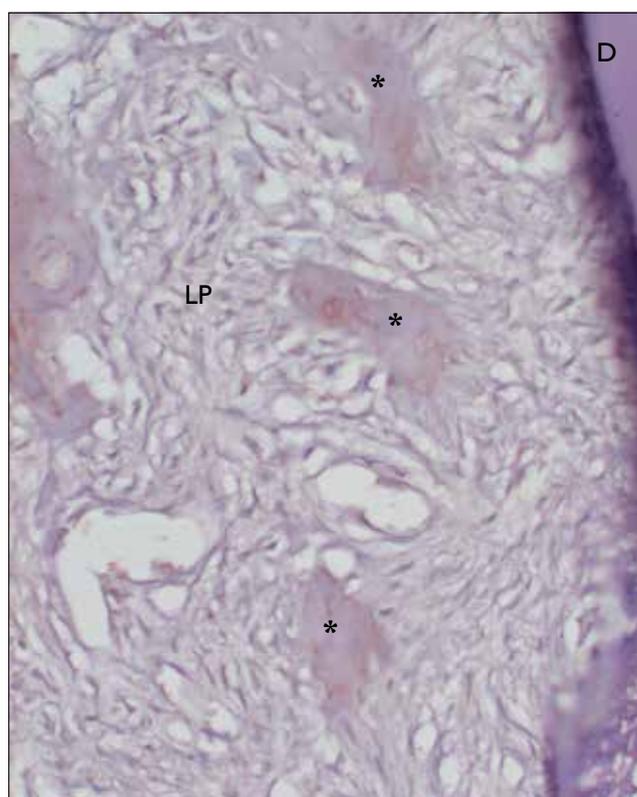


Figura 2.102 – Aspeto histológico da face mesial de pressão da raiz distal de M1, no qual é visível um processo de ossificação intramembranosa (\*) típico da reparação por regeneração do tecido ósseo que está a ocorrer. Hematoxilina, x200 no original. (D - dentina; LP - ligamento periodontal).

No que concerne aos estudos de IHC, neste grupo, tal como o observado no grupo anterior das 72 horas, foi possível identificar no lado de pressão, áreas de mesênquima onde estava a ocorrer ossificação intramembranosa. Aqui, observou-se a intensa expressão do TGF- $\beta$ 1 nos fibroblastos e em células com fenótipo de osteoblastos ou osteoblastos-like (Figura 2.103) adjacentes à parede óssea alveolar. À medida que se caminha para junto da superfície radicular, verificou-se uma diminuição da expressão do TGF- $\beta$ 1 nas células ligamento periodontal que se mantém, no entanto, nos cementoblastos (Figura 2.104). Adjacentes a vasos sanguíneos presentes no mesênquima foram patentes células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos a expressarem este fator de crescimento (Figura 2.105).

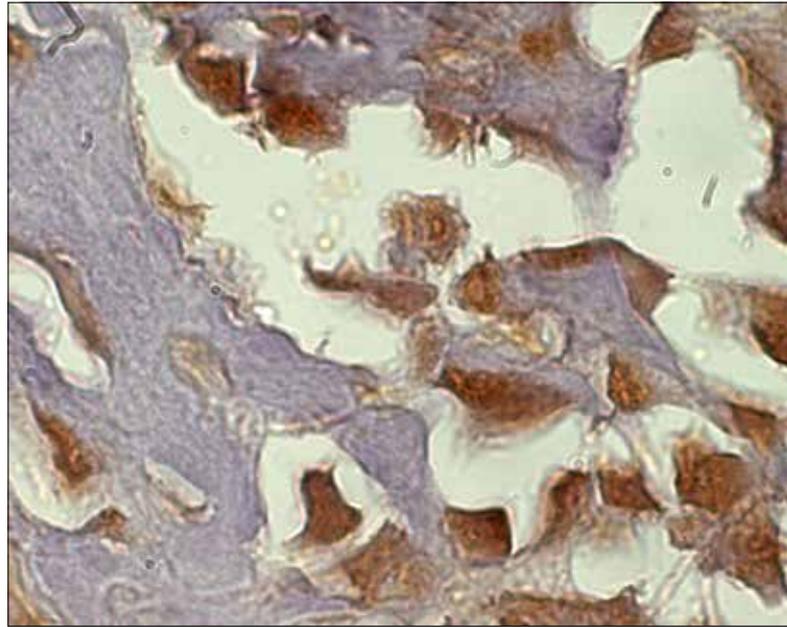


Figura 2.103 – Imagem histológica ilustrando células com fenótipo de osteoblastos ou osteoblastos-*like* a expressarem TGF- $\beta$ 1 numa área onde ativamente está a ocorrer ossificação intramembranosa. x1000 no original.

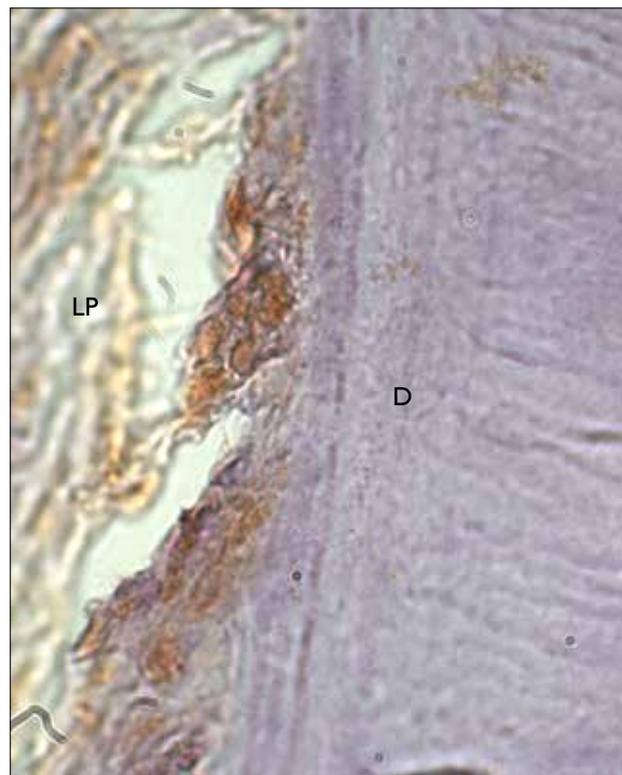


Figura 2.104 – Imagem histológica mostrando cementoblastos a expressarem TGF- $\beta$ 1. x1000 no original.  
(D - dente; LP - ligamento periodontal).

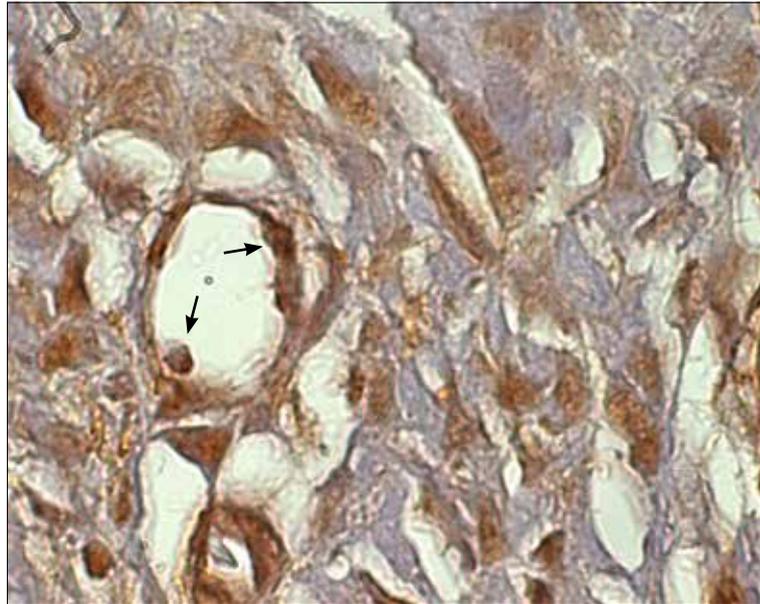


Figura 2.105 – Imagem histológica de células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta) adjacentes a metarteríolas presentes no mesênquima a expressarem TGF- $\beta$ 1. x1000 no original.

Tal como no grupo das 72 horas, em relação aos estudos de IHC utilizando anticorpos Smad2, foi possível observar a sua intensa expressão nos fibroblastos, osteoblastos, osteócitos e cementoblastos, em ambos os lados do movimento. Também neste grupo, os osteoblastos apresentaram uma expressão mais intensa que as restantes populações celulares. Além disso, foram também visíveis células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos adjacentes a vasos sanguíneos presentes no mesênquima a expressarem, apesar de tenuemente, a Smad2 (Figuras 2.106 a 2.108).

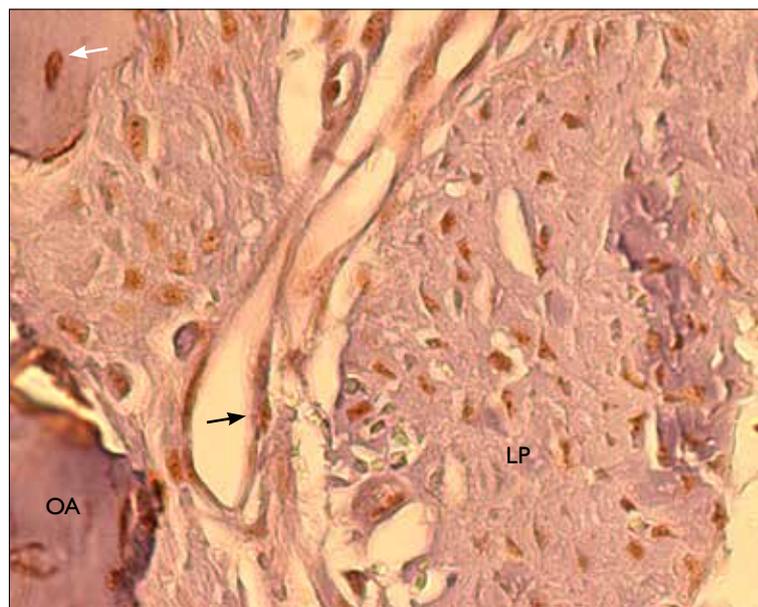


Figura 2.106 – Aspeto histológico do lado de pressão no qual são visíveis fibroblastos, osteócitos (seta branca) e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta preta) a expressarem Smad2. x400 no original.

(OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

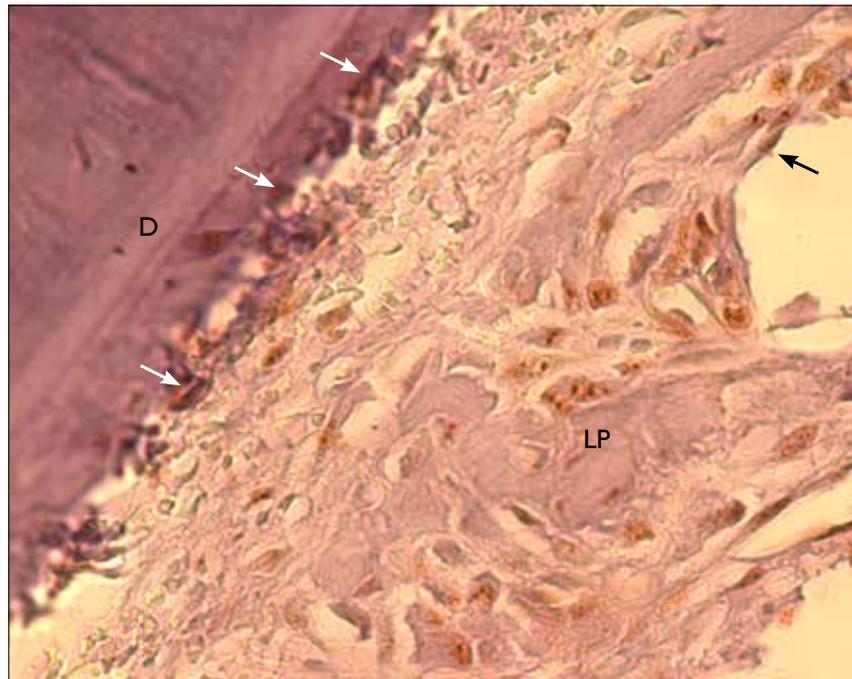


Figura 2.107 – Aspeto histológico do lado de tensão, no qual são visíveis fibroblastos, cementoblastos (seta branca) e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta preta) a expressarem Smad2. x400 no original. (D - dente; LP - ligamento periodontal).

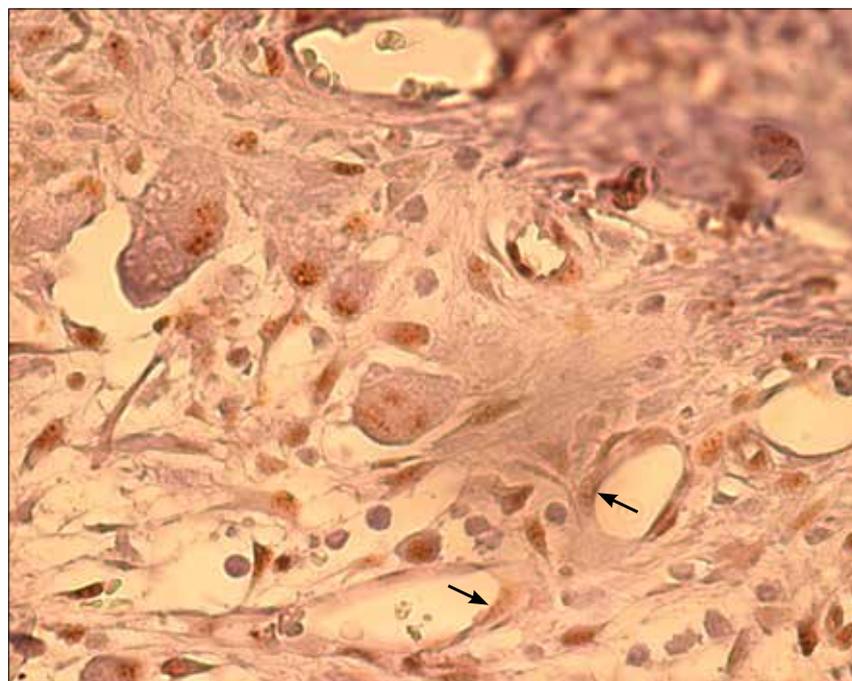


Figura 2.108 – Aspeto histológico do mesênquima, onde se observa a expressão Smad2 por fibroblastos e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta preta). x400 no original.

Tal como no grupos anteriores não foi possível verificar a existência de qualquer marcação positiva para a Smad3 em nenhuma das populações celulares presentes no ligamento periodontal (Figura 2.109).

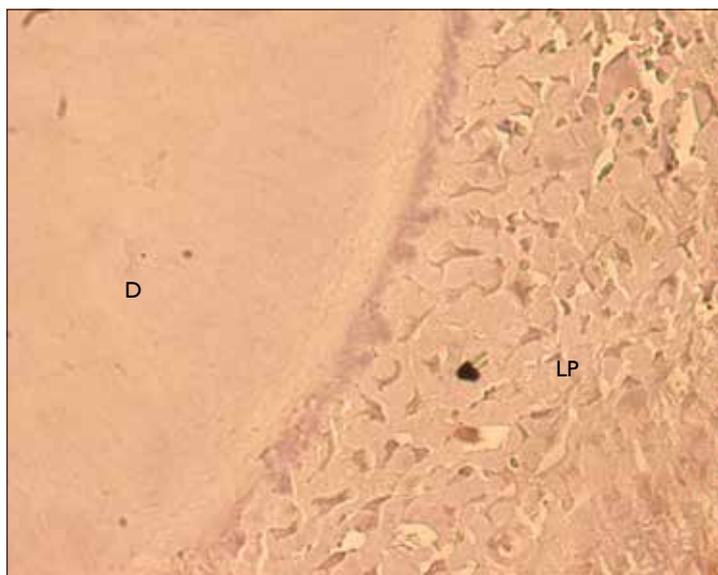


Figura 2.109 – Imagem histológica mostrando a ausência de expressão da Smad3. x400 no original.  
(D - dente; LP - ligamento periodontal).

No que diz respeito à IL-10, foi possível observar, ao longo de todo o ligamento periodontal, células com fenótipo de fibroblastos a expressarem a citocina. Em ambos os lados do movimento, osteoblastos aparentando um fenótipo osteoblasto-like proliferativo, expressaram intensamente a IL-10. De referir que, no lado de sujeito a forças de pressão, a localização preferencial dos osteoblastos correspondia, precisamente, ao ciclo de remodelação óssea, ou seja, encontravam-se adjacentes às lacunas de reabsorção osteoclástica para iniciar a fase de síntese. A expressão da IL-10 foi também observada nos cementoblastos, sendo, no entanto, esta expressão particularmente intensa no lado de tensão. Além disso, neste grupo experimental, foi revelada uma reação IHC muito menos intensa nos fibroblastos do que nos outros tipos celulares presentes no periodonto. Apesar de intensidade mais ténue, foi possível observar a expressão da IL-10 em algumas células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos perivasculares (Figuras 2.110 e 2.111).

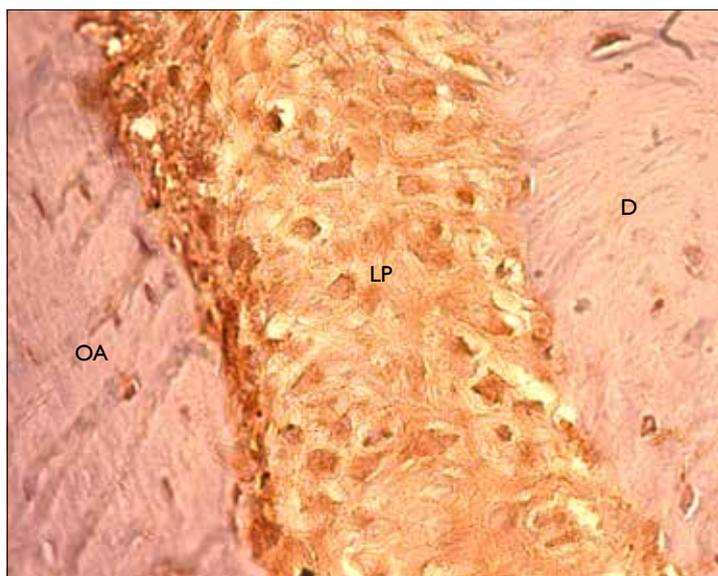


Figura 2.110 – Aspeto histológico do lado de pressão, no qual são visíveis fibroblastos a expressarem mais tenuemente do que os osteoblastos e cementoblastos a IL-10. x400 no original.  
(D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

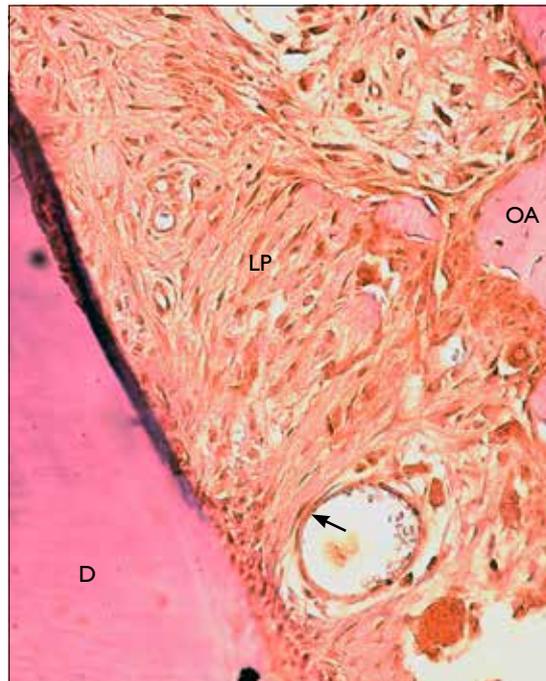


Figura 2.111 – Aspeto histológico do lado de tensão, no qual são visíveis fibroblastos a expressarem mais tenuemente a IL-10 que os osteoblastos e cementoblastos. Visíveis também células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta) a expressarem a citocina. x400 no original.  
(D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

Relativamente à  $\alpha$ -Sma, neste grupo experimental foram também observadas, no ligamento periodontal, algumas células a expressarem esta proteína, particularmente adjacentes à superfície radicular, presumindo-se que sejam células com fenótipo de miofibroblastos. Continuou-se também a identificar a expressão da  $\alpha$ -Sma na parede de algumas metarteríolas (Figuras 2.112 e 2.113). Tal facto além de confirmar a presença de células da musculatura lisa constituintes das paredes deste tipo de vasos sanguíneos, funciona também como um controlo positivo interno.

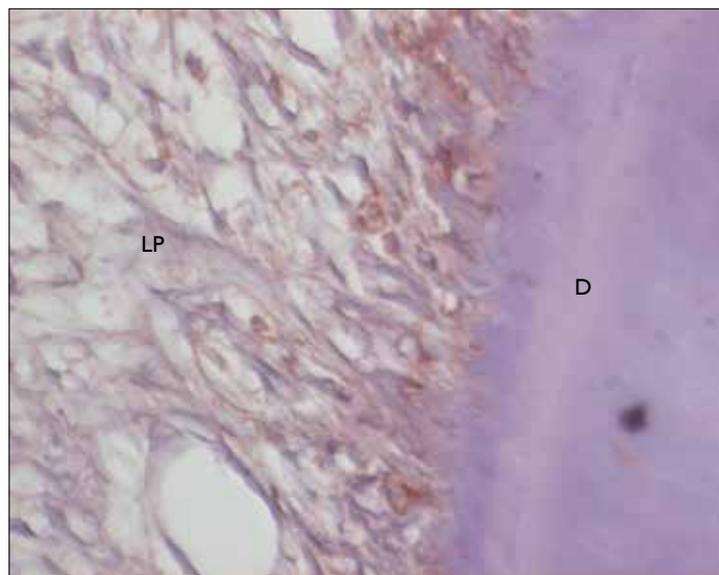


Figura 2.112 – Aspeto histológico do ligamento periodontal mostrando células com fenótipo de miofibroblastos junto à superfície radicular a expressarem  $\alpha$ -Sma. x200 no original.  
(D - dente; LP - ligamento periodontal).

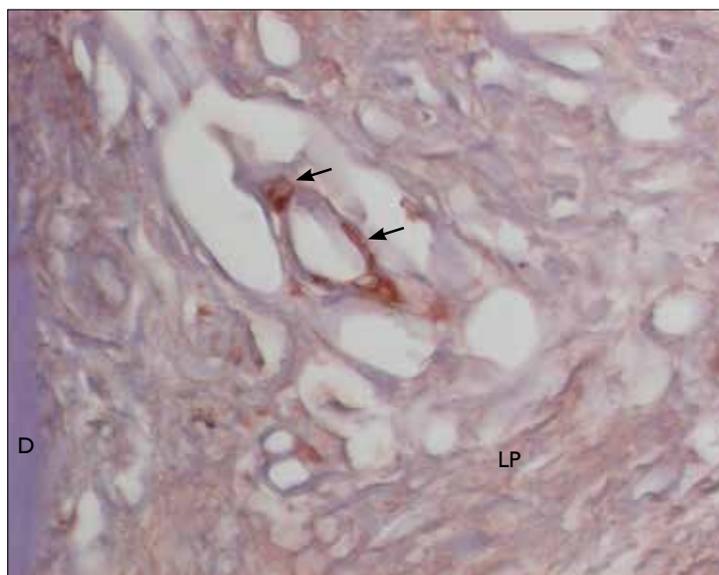


Figura 2.113 – Aspeto histológico do ligamento periodontal, mostrando a expressão da  $\alpha$ -Sma por células musculares lisas de uma metarteríola e por algumas células do ligamento periodontal, presumivelmente miofibroblastos. x200 no original. (D - dente; LP - ligamento periodontal).

Há ainda a salientar uma nítida diminuição da intensidade da expressão do PCNA em comparação com os grupos experimentais T02 e T03 e, por conseguinte, uma diminuição da concentração intracelular desta proteína. Neste grupo teste, verificou-se uma diminuição na quantidade de células do ligamento periodontal marcadas para o PCNA, sendo a densidade presente semelhante à das 24 horas. Este facto poderá indicar que após a diminuição da intensidade do estímulo constituído pela aplicação da força ortodôntica, a proliferação celular é mantida num nível bastante inferior àquele observado nos grupos experimentais das 48 e 72h. De salientar que também neste grupo experimental, no lado de tensão, foi observada uma menor densidade relativa de células a expressarem o PCNA (Figura 2.114).

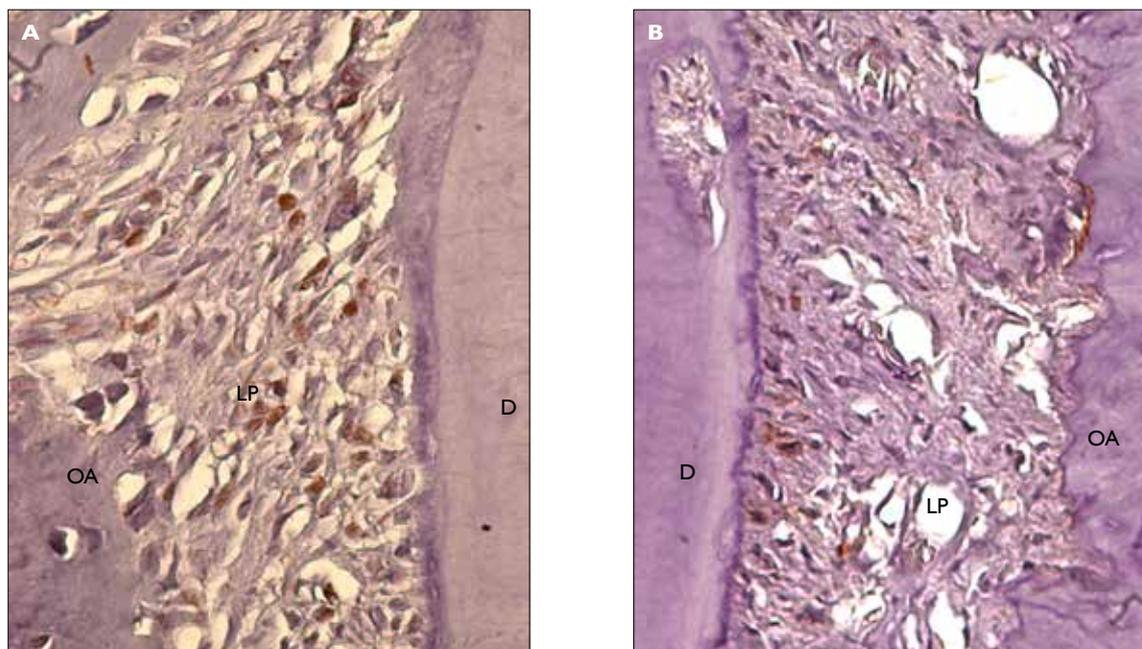


Figura 2.114 – Aspetos histológicos do periodonto do lado de pressão (A) e do lado de tensão (B), onde se observa uma expressão moderada do PCNA nos fibroblastos do ligamento periodontal. De notar a diferença na densidade das células marcadas, sendo esta muito menor no lado de tensão. x400 no original. (D - dente; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal).

Tabela II.5 – Resumo da histopatologia mais importante observada no ligamento periodontal e osso alveolar ao longo dos quatro períodos experimentais

	24 h (n=11)	48 h (n=10)	72 h (n=14)	96 h (n=12)
	Histopatologia	Histopatologia	Histopatologia	Histopatologia
Ligamento periodontal	Proliferação mesenquimatosa Angiogénese	Proliferação mesenquimatosa Angiogénese	Proliferação mesenquimatosa Angiogénese	Reparação na maior parte dos casos
Osso alveolar	Reabsorção mesial Aposição distal Remodelação	Reabsorção mesial Aposição distal Remodelação	Reabsorção mesial Aposição distal Ossificação intramembranosa Remodelação	Sem remodelação exagerada na maior parte dos casos Ossificação intramembranosa

No que diz respeito à IHC, relativamente a cada anticorpo, os resultados podem ser sintetizados do seguinte modo:

(1) O TGF- $\beta$ 1 apresentou, em todos os grupos, apenas expressão no lado de pressão. No grupo de controlo aquela foi apenas patente nos cementoblastos, mas a partir das 24 horas também os fibroblastos surgiram a expressarem o fator de crescimento, mantendo ambos os tipos celulares a expressão do fator de crescimento ao longo dos restantes períodos experimentais. A partir das 72 horas, a expressão do TGF- $\beta$ 1 tornou-se mais intensa junto à parede alveolar, surgindo células com fenótipo osteoblasto ou osteoblasto-like a marcá-lo positivamente, situação que persistiu às 96 horas. Neste último grupo experimental foram patentes células perivasculares, células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos, a expressarem o TGF- $\beta$ 1.

(2) A Smad2 esteve consistentemente expressa, intensamente, em todos os tecidos periodontais analisados, quer do lado de pressão quer do lado de tensão, ao longo de todos os períodos experimentais. Nos grupos iniciais, os cementoblastos apresentaram uma expressão mais intensa, mas à 72 e 96 horas, em ambos os lados do movimento, os osteoblastos foram a população celular que surgiram com uma expressão mais acentuada.

(3) A Smad3 não apresentou expressão em qualquer das populações celulares em nenhum dos grupos experimentais.

(4) A IL-10 esteve consistentemente expressa, com intensidade moderada, em todos os grupos experimentais, em ambos os lados do movimento dentário. Nestes grupos experimentais, os fibroblastos, cementoblastos e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos expressaram a citocina, tendo os fibroblastos, de um modo geral, apresentado uma expressão menos intensa que as outras populações celulares. Às 72 e 96 horas, osteoblastos e osteoblastos-like surgiram a expressar a IL-10, particularmente junto à superfície alveolar, área onde estava a ocorrer uma extensa remodelação do tecido ósseo, inclusivamente com processos de ossificação intramembranosa.

(5) A  $\alpha$ -Sma esteve consistentemente expressa em células da musculatura lisa de vasos sanguíneos presentes nas secções de todos os grupos experimentais. Às 72 e 96 horas surgiram algumas células, presumivelmente com fenótipo de miofibroblastos, a expressarem a proteína, particularmente junto à superfície radicular em qualquer um dos lados do movimento.

(6) O PCNA não apresentou expressão nas secções do grupo de controlo, podendo-se inferir que as células presentes quer no lado de pressão quer no lado de tensão do movimento estavam quiescentes. Às 24 horas foi observada uma pequena população de fibroblastos e cementoblastos-like a expressarem PCNA em ambos os lados do movimento. Às 48 horas continuou a ser visível o aumento da intensidade da expressão nos fibroblastos e cementoblastos-like presentes em ambos os lados do movimento. As 72 horas foram o período experimental em que a expressão do PCNA nos fibroblastos e cementoblastos-like foi mais intensa, sendo, no entanto, de salientar que as populações celulares marcadas apresentaram uma maior densidade celular no lado de pressão. Às 96 horas, foi flagrante a diminuição da densidade de células marcadas para o PCNA, surgindo com uma expressão muito semelhante à do grupo T01. De referir que neste último grupo experimental, também no lado de tensão, somente uma pequena população de células surgiu a expressar a proteína.



### 3. Discussão

A necessidade de compreender os mecanismos celulares e moleculares que estão na base do movimento dentário ortodôntico, particularmente durante o processo inflamatório por este induzido, é de fundamental importância. Este conhecimento poderá levar à introdução de novas práticas clínicas que resultem em tratamentos mais eficazes, mais rápidos e com o mínimo de efeitos secundários e iatrogênicos. Uma agressão constante e prolongada, teoricamente controlada, pode provocar danos celulares e teciduais, o que no caso específico do movimento ortodôntico se podem traduzir em sequelas como reabsorções radiculares ou perdas de tecido ósseo.

Tal como referido na introdução, dado as implicações clínicas de muitos mediadores moleculares da inflamação em diferentes patologias, muitos aspetos dos processos inflamatórios são atualmente objeto de estudo. A investigação está direcionada para a identificação dos elementos teciduais, celulares e bioquímicos participantes; tendo como objetivo a implementação de novas estratégias cujos alvos terapêuticos são esses mesmos mediadores moleculares (Schmid-Schönbein, 2006).

No entanto, o estudo dos processos inflamatórios em humanos é bastante limitado, a menos que as áreas de estudo sejam superficiais e acessíveis por técnicas microscópicas (Schmid-Schönbein, 2006). Este facto implica que no humano, o estudo dos mecanismos celulares dos processos inflamatórios que ocorrem ao nível do periodonto seja limitado. Assim, o recurso a modelos de experimentação animal permite ultrapassar esta restrição, principalmente nos estudos sobre movimento dentário ortodôntico que exigem a apreciação dos efeitos das forças aplicadas ao longo de determinados períodos de tempo, inclusivamente durante a fase de retenção (Reitan, 1967).

A escolha do modelo animal apropriado a um estudo experimental é essencial para o sucesso do protocolo a testar. Independentemente do facto do rato e do homem partilharem diversos mecanismos fisiológicos básicos, cada modelo experimental deve ser considerado como um componente individual do tema em estudo, não devendo ser apreciado isoladamente nem ocorrer a extrapolação direta de dados obtidos para o humano (Mahadeva e Shapiro, 2002). Contudo, dentro de certos limites, essa extrapolação é possível nos estudos de movimento dentário efetuados em modelos experimentais em rato (Ren e col., 2004).

Face ao exposto, no presente trabalho, com vista ao estudo *in vivo* do envolvimento da via de sinalização canónica do TGF- $\beta$  nas alterações do periodonto durante o movimento dentário ortodôntico experimental,

utilizaram-se ratos da estirpe *Wistar*. A opção pelo rato *Wistar* visou principalmente garantir a obtenção de resultados relevantes e a revisão da literatura confirmou que os modelos experimentais que utilizam estes animais já foram consistentemente validados, demonstrando serem adequados a estudos sobre movimento dentário provocado (Rygh e Selvig, 1975; Brudvik e Rygh, 1993; Ribeiro e col., 2013). Também foram ponderadas as considerações éticas e os testes preliminares confirmaram a baixa morbidade e a viabilidade do protocolo experimental elaborado.

Dado que nos estudos experimentais uma variável como a idade pode mascarar ou agravar as alterações naturalmente decorrentes do envelhecimento (Leong e col., 2012) e como atualmente 3/4 dos doentes que recorrem à consulta de ortodontia têm idade inferior a 27 anos (Kuitert, 2000), foi fundamental a seleção de animais com a idade apropriada ao estudo a realizar. Muito embora, o ligamento periodontal dos ratos *Wistar* conserve as suas propriedades biomecânicas até às 24 semanas de vida, o envelhecimento altera a capacidade de remodelação dos tecidos periodontais, havendo diminuição da densidade celular (Komatsu e col., 2004) e da atividade proliferativa (Stahl e col., 1969), bem como uma menor produção de componentes da matriz extracelular orgânica e de Colagénio solúvel (Stahl e Tonna, 1977). Por este motivo, optou-se na elaboração do presente trabalho pela utilização de animais com 12 semanas de idade que no humano apresentam uma correspondência aproximada aos 17 anos de idade (Andreollo e col., 2012; Sengupta, 2012).

A opção por animais do género masculino, além de uniformizar o género a utilizar, teve como objetivo principal eliminar do estudo qualquer interferência resultante dos ciclos hormonais característicos dos animais do género feminino (Bolon, 2010).

Existem diferenças morfológicas e fisiológicas entre os tecidos periodontais do rato e do homem: o osso alveolar do rato é mais denso do que o humano, existe menos material osteóide ao longo da superfície alveolar, há diferenças no arranjo estrutural das fibras ligamentares e das estruturas de suporte e as alterações dos tecidos periodontais associadas ao movimento dentário ocorrem mais rapidamente no rato (Reitan e Kvam, 1971; Ren e col., 2004; Di Domenico e col., 2012). Contudo, apesar destas diferenças, os mecanismos biológicos subjacentes ao movimento dentário ortodôntico são considerados como basicamente os mesmos (Ren e col., 2004).

No modelo experimental usado neste trabalho, utilizou-se o método de Waldo e Rothblatt (Waldo e Rothblatt, 1954) como método de indução de força, dado que além de já ter sido previamente testado e validado (Waldo e Rothblatt, 1954; Zaki e Vanhuysen, 1963; Muraoka e col., 2010; Tanabe e col., 2010), permitiu assegurar a reprodutibilidade em todos os animais do estudo. É um método que apresenta como grande vantagem a sua fácil execução, necessitando de poucos meios técnicos para o implementar. No entanto, o método não é isento de desvantagens, uma vez que a intensidade da força produzida pelos elastómeros utilizados é desconhecida e variável ao longo do tempo em que eles estão ativos (Ren e col., 2004) e os elastómeros degradam-se e perdem elasticidade ao fim de quatro dias (Kobayashi e col., 1998). No entanto, como neste estudo se pretendeu apenas estudar a via de sinalização canónica do TGF- $\beta$  na fase inicial do movimento dentário e porque neste modelo animal os processos de reparação tecidual são particularmente rápidos, estenderam-se os tempos experimentais apenas às 24 (T01), 48 (T02), 72 (T03) e 96 horas (T04), períodos durante os quais os elastómeros mantêm as suas propriedades físicas.

A utilização deste método de indução de movimento dentário experimental exigiu que durante o processamento histológico as amostras fossem orientadas de modo a serem efetuados cortes seriados vestibulo-palatinos. Uma vez que o movimento produzido foi principalmente de versão, gerando e distribuindo diferentes forças de tensão e pressão no ligamento periodontal, quer no lado mesial quer no lado distal, as secções sagitais obtidas para análise histológica e análise por IHC permitiram a observação preferencialmente do primeiro molar maxilar, respetivo ligamento periodontal e osso alveolar em toda a extensão do seu longo eixo corono-apical.

A análise das imagens histológicas demonstrou que a metodologia utilizada no processamento das amostras foi, tal como já referido, apropriada para observação por microscopia de luz, permitindo a obtenção de secções de boa qualidade e de material bem preservado. Contudo, a presença na mesma amostra de tecidos moles e tecidos duros, estes últimos necessitando de ser descalcificados, levou à produção de artefactos técnicos no momento de processamento do material, surgindo áreas de retração tecidual e dobras características em alguma das secções observadas. Estes artefactos, desprezíveis em quantidade e zona afetada, não invalidaram as observações realizadas, permitindo uma boa observação das alterações histológicas decorrentes dos eventos associados ao movimento ortodôntico criado.

No que diz respeito à análise por IHC, a qualidade final da marcação dependeu não só da fixação e do processamento do tecido em causa, subsistindo as mesmas limitações existentes nas secções para estudo histológico e morfológico, mas também da escolha dos anticorpos primários. Não havendo trabalhos prévios sobre a utilização no periodonto de ratos *Wistar* de alguns dos anticorpos aqui estudados, nos quais este protocolo experimental se pudesse alicerçar, a otimização dos anticorpos mostrou-se algo morosa e complexa. Além do mais, a IHC realizada em material descalcificado apresenta condicionantes diversas que se traduzem em alterações adversas da morfologia dos tecidos presentes nas amostras e, eventualmente, na qualidade da marcação efetuada, nomeadamente porque durante a descalcificação, os mesmos agentes que removem rapidamente os iões cálcio podem afetar as propriedades da matriz orgânica não calcificada (Sanjai e col., 2012). Assim, presume-se que o método de recuperação dos antigénios e as diferenças de densidade entre os tecidos moles e os tecidos duros presentes estejam na origem de alguns artefactos observados durante a realização da IHC. Também aqui, os artefactos foram considerados desprezíveis em quantidade e zona afetada, não invalidando as observações realizadas.

Estando o corpo humano constantemente sujeito a cargas funcionais, tornou-se premente a avaliação dos efeitos das referidas cargas nos diferentes tipos de tecidos presentes. Estes efeitos têm sido largamente estudados em células que no seu conjunto estão sujeitas a forças funcionais e sob o efeito de tensões de fluidos, tais como células endoteliais (Bundey, 2007), células do músculo liso (Reusch e col., 1996), fibroblastos da derme (Deng e col., 2009), fibroblastos dos pulmões (Breen e col., 1999) e fibroblastos do ligamento periodontal (Diercke e col., 2011). Deste modo, os fibroblastos encontram-se integrados num grupo de células que responde à aplicação de forças e tensões mecânicas que se fazem sentir quer em situações fisiológicas quer em situações patológicas (Wang e Thampatty, 2006).

As propriedades mecânicas e biológicas dos tecidos conjuntivos e mesenquimatosos são determinadas pela orientação da matriz extracelular e, mais especificamente, pela orientação das fibras de Colagénio (Delaine-Smith e col., 2014). Quando estes tecidos são sujeitos a deformações de origem mecânica, os fibroblastos neles presentes adaptam-se a estas novas exigências funcionais, modificando o arranjo das fibras de Colagénio (Davidovitch, 1991; Delaine-Smith e col., 2014). No entanto, no que concerne ao ligamento periodontal, sabe-se que a resposta deste à aplicação de forças é complexa, dado que este tecido: (1) responde como um sólido hiperelástico quando sujeito a tensão; (2) apresenta um comportamento viscoso quando sujeito a compressão (Bergomi e col., 2010); (3) responde rigidamente a deformações rápidas como as originadas pela mastigação (4) e apresenta uma deformação elastoplástica quando sujeito a forças leves e contínuas como as utilizadas no movimento dentário ortodôntico (Fill e col., 2011).

Especificamente, no movimento ortodôntico, em resposta à aplicação de forças, os fibroblastos presentes no ligamento periodontal são das primeiras populações celulares a reagir às alterações mecânicas do ligamento (Diercke e col., 2011), dado que o tecido periodontal é reestruturado e o citoesqueleto das suas células é adequadamente modificado (Pan e col., 2014). A aplicação de forças ativa a mecanoceção, uma vez que as células constituintes do ligamento periodontal detetam as alterações estruturais da matriz extracelular produzidas pelas forças externas. Em consequência, o estímulo resultante da aplicação das forças ativa vias de

sinalização que promovem a transdução do sinal produzido e a respetiva resposta celular (Kjaer, 2004; Redlich e col., 2004). Este conjunto de eventos induz a remodelação quer da vasculatura quer da matriz extracelular do ligamento, da gengiva e do osso alveolar; processo aliás facilitado pela proliferação e apoptose das células presentes no ligamento, pela diferenciação dos precursores das células dos tecidos ósseos e pela migração de leucócitos dos espaços microvasculares (Krishnan e Davidovitch, 2006; Krishnan e Davidovitch, 2009).

De referir que o estudo do movimento ortodôntico feito com base em métodos histológicos traduz-se numa avaliação que se apoia no conceito de pressão-tensão do movimento que está na base da teoria do fluxo sanguíneo. Apesar desta teoria não ser atualmente considerada tão evidente (Melsen, 1999; Melsen, 2001), a terminologia ainda é utilizada com objetivos descritivos, académicos e pedagógicos.

O movimento dentário ortodôntico implica a translocação concomitante do dente e do alvéolo no sentido do deslocamento criado, o que acontece através de uma extensa remodelação dos tecidos periodontais, a qual só é possível devido à grande plasticidade do tecido ósseo e ao constante *turnover* do ligamento periodontal (Verna e col., 1999; Roberts-Harry e Sandy, 2004; Persson, 2005; Krishnan e Davidovich, 2006). Inicialmente ocorre um movimento de versão que rapidamente desloca o dente no interior do alvéolo e durante o qual é principalmente a coroa que se move. Só após a reabsorção óssea da parede alveolar do lado do movimento é que o dente será capaz de se deslocar em gressão (Reitan, 1967). Reações tecidulares indesejáveis como a reabsorção radicular e a necrose estéril com o conseqüente aparecimento de tecido necrótico, fenómeno chamado de hialinização, são componentes importantes do processo de movimentação dentária ortodôntica (von Böhl e Kuijpers-Jagtman, 2009). De salientar que o período de hialinização é, no entanto, variável entre espécies, podendo ser mais prolongado em animais com uma maior densidade óssea tal como o rato *Wistar* (Reitan, 1967).

Efetivamente, os dentes sob o efeito de forças ortodônticas controladas deslocam-se através de áreas de reabsorção direta frontal no lado do movimento, havendo a concomitante aposição óssea no lado oposto ao movimento, numa tentativa do sistema em manter as dimensões do espaço periodontal. Dado que, mesmo com recurso a forças leves controladas, é inevitável a necrose celular e a hialinização (von Böhl e Kuijpers-Jagtman, 2009), o movimento deverá ser dividido em três períodos distintos:

- (1) Um período inicial de movimento rápido, em que o dente sofre versão e se desloca apenas no interior do espaço periodontal, percorrendo 0,3 a 0,9 mm e que dura de algumas horas a dois dias;
- (2) Uma fase de latência, na qual o dente não se movimenta devido ao processo de hialinização e que dura entre três a cinco dias;
- (3) Um segundo período de movimento que ocorre após a remoção do tecido hialinizado, que dura de 7 a 14 dias, e que é considerado o período de verdadeiro movimento (Reitan, 1967; Rygh e Reitan, 1972; Lindauer e Britto, 2000).

No método de Waldo e Rotblatt, devido à versão do primeiro molar maxilar na fase inicial do movimento, as áreas de compressão criadas pelas raízes deste dente encontram-se:

- (1) Na raiz mesial - ao nível da metade coronária mesial, do ápex propriamente dito e da porção apical distal;
- (2) Na raiz distal - ao nível da metade coronária mesial e da metade apical distal.

Relativamente às áreas de tensão, estas encontram-se:

- (1) Na raiz mesial - ao nível da metade coronária distal e da metade apical mesial;
- (2) Na raiz distal - ao nível da metade coronária distal, do ápex propriamente dito e da metade apical mesial (Waldo e Rothblatt, 1954).

De modo a melhor se perceberem e facilitar a interligação dos resultados obtidos, optou-se por organizar a discussão de acordo com a seguinte sequência:

A. Resultados histológicos:

- (1) Hialinização;
- (2) Reabsorção radicular;
- (3) Reabsorção e aposição óssea;
- (4) Ossificação intramembranosa;
- (5) Angiogénese;
  - TGF- $\beta$  e angiogénese.

B. Resultados dos biomarcadores biológicos:

- (1) Osteogénese - TGF- $\beta$ , Smad3 e Smad2;
- (2) Inflamação - células inflamatórias;
  - TGF- $\beta$ , Smad3 e Smad2;
  - IL-10;
- (3) TGF- $\beta$  na cavidade oral e no movimento dentário ortodôntico;
- (4) Fibroblastos e remodelação do tecido conjuntivo ligamentar no movimento dentário ortodôntico;
- (5) Reposição celular da população de fibroblastos:
  - a) Proliferação celular - PCNA;
    - TGF- $\beta$ , Smad3 e Smad2;
    - resposta fibrótica.
  - b) Migração celular - Miofibroblastos e  $\alpha$ -Sma;
    - resposta fibrótica;
  - c) Diferenciação celular - células mesenquimatosas indiferenciadas/células estaminais do ligamento periodontal/péricitos e TGF- $\beta$ ;
  - d) EMT e transição endotelial-mesenquimal (EndMT, *endotelial-mesenchymal transition*).

No presente estudo, a análise histológica descritiva foi, de um modo geral, concordante com o que tem sido descrito na literatura (Waldo e Rothblatt, 1954; Reitan, 1975; Proffit e Fields, 2000; Persson, 2005; Krishnan e Davidovich, 2006), verificando-se que ao longo dos quatro períodos experimentais, os eventos mais significativos ocorreram nos três primeiros dias, ficando às 96 horas praticamente estabelecidas a remodelação e regeneração do ligamento periodontal e do osso alveolar adjacentes às raízes do primeiro molar maxilar.

O aparecimento de zonas de hialinização associadas principalmente a áreas de compressão no lado mesial do movimento, foi efetuada logo às 24 horas. Estas zonas encontravam-se maioritariamente adjacentes à superfície radicular, o que está de acordo com as observações de Kurol e Owman-Moll (1998) em humanos. Esta resposta imediata do ligamento periodontal do rato *Wistar* a uma força de pressão apreendida como uma agressão, já era espetável, devido à resposta fisiológica que o ligamento deste animal experimental normalmente tem. De facto, sabe-se que no rato, o rápido desenvolvimento de áreas de hialinização, com a consequente perda celular, ocorre entre as 24 e as 48 horas após a aplicação da força e são células macrófago-like, fibroblasto-like e células gigantes multinucleadas, as referenciadas como responsáveis pela remoção dos tecidos hialinizados

(Brudvik e Rygh, 1993a; Brudvik e Rygh, 1993b; Brudvik e Rygh, 1994a; von Böhl e Kuijpers-Jagtman, 2009; Zainal Ariffin e col., 2011). Por seu turno, no lado da superfície óssea alveolar, as zonas hialinizadas, caso estejam presentes, são removidas por osteoclastos com origem nos espaços endosteais através de reabsorção óssea indireta (Reitan, 1960).

O período crítico à sobrevivência das células presentes nas áreas hialinizadas do ligamento varia entre 30 minutos a duas horas quando a força aplicada tem uma intensidade variável entre 5 e 20g (Rygh, 1972). Contudo, como no presente estudo, se provocou deslocamento dentário com recurso à inserção de um elastómero entre o primeiro e segundo molares maxilares, desconheceu-se a intensidade e a taxa de declínio da força aplicada ao longo do tempo, bem como as alterações dimensionais que o elastómero sofreu durante a descompressão (Ren e col., 2004). No entanto, como se pretendeu avaliar apenas os efeitos da aplicação da força no período inicial do movimento dentário ortodôntico, a intensidade da força só foi relevante porque o deslocamento do dente ao longo do perímetro periodontal foi mais rápido, promovendo a compressão do ligamento por mesial. Por este motivo, a quantidade de movimento absoluto não foi significativa, ao contrário do que acontece, nomeadamente, em estudos comparativos entre forças de baixa e alta intensidade (Burstone, 1994).

No trabalho presentemente realizado, verificou-se ainda que a hialinização persistiu até às 72 horas, sempre mais acentuada nas regiões adjacentes ao cimento radicular, não sendo observada às 96 horas, período durante o qual, em ambos os lados do ligamento periodontal, a reparação por regeneração tecidual já se encontrava bastante avançada. Em algumas secções dos Grupos T01, T02 e T03, nos quais a hialinização foi visível, as fibras ligamentares no lado de pressão apresentaram-se sempre algo desorganizadas. Em nenhuma das secções analisadas foi detetada qualquer lacuna de reabsorção radicular associada diretamente a estas zonas de hialinização, apesar de terem sido observadas áreas de reabsorção radicular independentes e não relacionadas. Este facto permite pressupor que o tecido nestas zonas estará necrótico e ainda no início do processo de reorganização, dado que as zonas de hialinização são áreas acelulares que induzem respostas celulares dos tecidos ósseo e radicular adjacentes (Kvam, 1969; Rygh, 1974; Lilja e col., 1983). Durante este processo é essencial a libertação de enzimas que participam na reorganização e eliminação do tecido necrótico e que atraem células fagocitárias (Hellsing e Hammarstrom, 1996; Kurol, 1998).

As lacunas de reabsorção radicular observadas, mais pequenas e não associadas a zonas de hialinização são, possivelmente, acontecimentos normais produzidos por lesões intermitentes do ligamento periodontal e da superfície radicular durante a função fisiológica da mastigação tal como o referido por Hellsing e Hammarstrom (1996). Também o facto do rato *Wistar* ser monofiodonte, não tendo uma segunda dentição, poderá explicar a tendência à reabsorção radicular, tendo sido as lacunas de reabsorção mais frequentemente observadas nas superfícies marginais do que no extremo apical tal como o descrito por Reitan e Kvam (1971).

No humano, esta hialinização será sempre produto da compressão do ligamento e teoricamente impossível de evitar. Em circunstâncias normais, durante o tratamento ortodôntico, só após a eliminação das primeiras áreas de hialinização e com o controlo adequado da intensidade da força e dos movimentos produzidos, deverá ser possível evitar a criação de mais zonas de hialinização (Reitan, 1967).

Neste estudo, a reabsorção óssea da superfície alveolar foi, de um modo geral, concordante com o que previamente se sabe sobre o movimento dentário, estando concentrada no lado do movimento, no qual a força de pressão aplicada produz compressão do ligamento periodontal com a consequente remodelação do osso alveolar que decorre com reabsorção do tecido ósseo da superfície alveolar.

É, no entanto, importante lembrar que o rato *Wistar* apresenta uma alta capacidade de remodelação das estruturas alveolares (Reitan e Kvam, 1971). Áreas de repouso, de reversão e de reabsorção da superfície alveolar são frequentemente observadas, estando todas relacionadas com fenómenos de remodelação periódica do osso alveolar sujeito à função mastigatória (Tonna, 1959; Schneider, 1968).

Contrariamente ao que acontece no humano, no qual a migração fisiológica ocorre no sentido mesial, no rato os molares migram em sentido distal, provavelmente devido à resultante das forças oclusais produzidas durante a mastigação (Reitan e Kvam, 1971; Tsuchiya e col., 2014). Esta migração distal foi observada no grupo C0I de controlo, onde apesar da superfície do osso alveolar se apresentar íntegra, surgiu sempre algo irregular na maior parte das secções. Neste grupo foram ainda perceptíveis lacunas de reabsorção alveolar principalmente no lado distal das raízes do primeiro molar, lado associado à força de pressão no movimento dentário fisiológico.

Observou-se também, em algumas secções de todos os grupos teste, a persistência de áreas de reabsorção óssea direta na parede alveolar distal, zona que nestes grupos estaria sujeita à ação da força de tensão. No grupo T0I pode-se eventualmente presumir que estas áreas correspondam à manutenção, às 24 horas, dos processos de remodelação óssea induzidos pelo deslizamento fisiológico distal que ainda não foram concluídos. Nos grupos teste mais tardios a presença de reabsorção óssea na superfície sujeita a tensão é de questionar, sendo de supor que esta poderia ser um fenómeno característico da fisiologia deste animal que continuamente responde às forças mastigatórias. Efetivamente, no lado de tensão, os osteoclastos observados em condições fisiológicas, deveriam tender a diminuir em número, chegando a desaparecer completamente se se mantivesse a aplicação da força (Azuma, 1970). Esta dúvida poderá ser eventualmente esclarecida recorrendo a um modelo experimental cujo desenho inclua a extração dos molares antagonistas, eliminando a variável força oclusal, dado que as forças oclusais, a musculatura perioral e a língua atuam sobre os dentes durante o movimento dentário experimental (Kohno e col., 2002). De referir, no entanto, que nos grupos experimentais ativos foi visível a diminuição relativa do diâmetro do espaço periodontal mesial, principalmente na região cervical, concordante com o deslocamento em versão da coroa do primeiro molar maxilar neste sentido.

Em todos os grupos teste, a reabsorção óssea observada no lado de pressão mesial foi sempre direta e frontal, não tendo sido detetada reabsorção óssea indireta. Apesar da descompressão inicial dos elastómeros estar relacionada com a libertação de forças de alta intensidade (Hadj-Salem, 1971), levando à produção de áreas de hialinização junto à superfície radicular tal como as observadas em secções das 24, 48 e 72 horas, pode-se assumir que os elastómeros utilizados neste estudo não geraram forças com intensidades suficientemente grandes para criarem áreas de hialinização junto à superfície óssea alveolar que necessitassem de ser removidas através de reabsorção óssea indireta. A exuberância dos processos biológicos a ocorrer nos espaços endosteais do osso alveolar adjacente às raízes do primeiro molar, observados em muitas secções dos vários grupos experimentais, inclusive no grupo de controlo, é típica da fisiologia do animal usado neste estudo experimental, pelo que não foram considerados fenómenos de reabsorção óssea indireta como em estudos anteriores (Macapanpan, 1954; Waldo e Rothblatt, 1954; Azuma, 1970; Rygh e Moyers, 1988; Brudvik e Rygh, 1993b; Brudvik e Rygh, 1994b; Johnson, 2007). Estudos anteriores demonstraram que a aposição de osteóide nos espaços medulares do osso esponjoso alveolar e em áreas não sujeitas a reabsorção direta, visível também sob a forma de linhas de reversão, é efetuada por células com origem no endóstio (Oppenheim, 1930; Thilander e col., 2000), garantindo que as dimensões do tecido ósseo de suporte sejam mantidas.

No lado de tensão do movimento verificou-se a aposição de tecido ósseo nas secções de todos os grupos teste do presente trabalho, detetada através das características linhas de reversão presentes nas superfícies alveolares distais às raízes do primeiro molar. Sabe-se que os osteoblastos recém-formados, recrutados no reservatório local de células e, neste estudo, visíveis ao longo dos feixes de fibras estiradas, alguns deles ligeiramente separados devido à tensão exercida, são as células responsáveis pela deposição de novo osteóide que vai recobrir toda a parede alveolar (Azuma, 1970; Thilander e col., 2000).

No entanto, convém referir que, no trabalho atual, foram também observadas linhas de reversão em áreas sujeitas à força de pressão, locais onde o tecido ósseo alveolar apresentava lacunas de reabsorção

contendo osteoclastos. Estes resultados contradizem aquilo que é referido como normal na teoria do fluxo sanguíneo (Oppenheim, 1930; Waldo e Rothblatt, 1954; Reitan, 1967; Azuma, 1970; King e col., 1991; Ashizawa e Sahara, 1998), mas estão, no entanto, de acordo com os dados descritos por Verna e colaboradores (1999) e por Melsen (1999, 2001).

Assim, os resultados histológicos no que dizem respeito à presença de lacunas de reabsorção no lado de tensão, bem como à presença de linhas de reversão no lado de pressão nas secções dos grupos teste poderão ser explicados pela teoria mecanostática (Frost, 2001, 2003), dada a libertação inicial pelo elastómero de uma força de grande intensidade (Hadj-Salem, 1971). Ao contrário dos ortodontistas que associam reabsorção óssea a forças de pressão e aposição óssea a forças de tensão, os ortopedistas relacionam a aplicação de cargas com a aposição de tecido ósseo. Na teoria mecanostática, Frost (2001, 2003) estabelece a relação entre várias intensidades de forças e o balanço entre a remodelação e modelação do tecido ósseo. De acordo com o autor, forças de baixa intensidade levam a perdas ósseas devido a uma remodelação intensa. Contudo, à medida que a intensidade das forças aumenta, estabelece-se um equilíbrio entre reabsorção e aposição e inicia-se o processo de modelação, no qual o novo osso depositado é lamelar. Já o tecido ósseo medular forma-se como resultado de forças ainda mais intensas (Melsen, 2001). No entanto, se estas forças forem exageradas, o desequilíbrio resultante levará a que a reparação não seja eficaz na eliminação das microfaturas de fadiga que consistentemente se formam (Burr, 1985).

É importante também compreender que os padrões de distribuição das forças aplicadas são complexos e que as respostas tecidulares nos lados opostos do movimento podem ser predominantemente, mas não unicamente, o resultado de forças opostas. Assim, a aplicação de forças ortodônticas poderá estar mais relacionada com alterações da morfologia da estrutura do tecido ósseo local do que propriamente com a determinação de áreas de compressão e estiramento. De acordo com a regra da “deriva/flexão” de Epker e Frost (1965) e com a lei de Wolf redefinida por Frost (1990), zonas de formação óssea ocorrem nas superfícies côncavas e zonas de reabsorção ocorrem nas superfícies convexas criadas pela flexão do tecido. A transdução e distribuição das forças de pressão e tensão criadas no interior do ligamento periodontal levaria, deste modo, a alterações da morfologia da cavidade alveolar com a sua conseqüente deriva, translocando o alvéolo conjuntamente com o dente em movimento (Verna e col., 1999).

No presente estudo, um dos eventos mais relevantes da resposta reparadora do sistema agredido foi a ossificação intramembranosa observada, às 72 e 96 horas no lado de pressão. No mecanismo de osteogénese que ocorre através deste tipo de ossificação, a formação de osso resulta da deposição direta de tecido ósseo numa matriz de tecido conjuntivo primitivo ou mesênquima. Neste tecido primitivo, ocorre a condensação de células mesenquimatosas precursoras que se diferenciam em osteoblastos que secretam um osteóide rico em Colagénio, o qual posteriormente será mineralizado (Jabalee e Franz-Odenaal, 2015). Para que este processo seja eficaz são necessárias interações intensas entre as células mesenquimatosas precursoras, os osteoblastos e os vasos sanguíneos circundantes (Thompson e col., 1989; Zelzer e col., 2002; Jacobsen e col., 2008). Neste processo, as células endoteliais são participantes fundamentais, fornecendo aos osteoblastos e aos seus precursores a sinalização essencial ao correto desenvolvimento, promovendo nomeadamente a sobrevivência, diferenciação e/ou proliferação celular (Jabalee e Franz-Odenaal, 2015). No entanto, após uma diminuição transitória inicial, o número de vasos sanguíneos periodontais aumenta (Anastasi e col., 2008) e só invadem as áreas onde ocorrerá neoformação de tecido osso após se iniciar a osteogénese (Thompson e col., 1989; Jourdeuil e Franz-Odenaal, 2013).

No presente estudo, foi observado, logo às 24 horas, o aumento relativo do número de microvasos adjacentes principalmente junto à superfície alveolar do lado de pressão que se manteve durante os restantes períodos experimentais. De facto, nesta zona, onde foi perceptível uma remodelação intensa com a presença de

lacunas de reabsorção óssea e de linhas de reversão, foi patente a presença de neovasos consistente com um mecanismo de angiogênese. De salientar que a angiogênese e a remodelação microvascular são características intrínsecas de um processo de inflamação crônica e fatores fundamentais à remodelação da matriz extracelular durante a reparação tecidual (Libby, 2007). Consequentemente, tanto a ossificação intramembranosa como a neoformação de vasos sanguíneos, observadas no presente trabalho, vêm confirmar que ocorreu ao nível do ligamento periodontal um processo de regeneração, remodelação e adaptação tecidual.

A angiogênese, formação de neocapilares a partir vasos sanguíneos pré-existentes (Ferrari e col., 2009), é um mecanismo complexo que envolve a ativação das células endoteliais por múltiplos estímulos como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. Estas células uma vez ativadas iniciam a migração em direção à fonte produtora dos estímulos, proliferando, diferenciando-se e organizando-se. Durante os processos de reparação, uma vez estabilizada a organização multicelular estabelecida pelas células endoteliais e péricitos, observa-se a regressão das células endoteliais dos capilares (Furcht, 1986). Os neovasos em formação regulam positivamente a expressão dos recetores celulares de fatores angiogénicos como o TGF- $\beta$  (Roberts e col., 1986; Madri e col., 1988; Yang e Moses, 1990; Carmeliet, 2003), cuja isoforma TGF- $\beta$ 1 tem valores elevados no endotélio humano e no tecido hematopoiético, onde atua como regulador autócrino e parácrino do crescimento das células endoteliais e das células hematopoiéticas (Gatherer e col., 1990). De referir também que a maior fonte de TGF- $\beta$  *in vivo* são as plaquetas (Giacomini e col., 2012). O TGF- $\beta$  induz a angiogênese (Madri e col., 1988), muito embora iniba o crescimento das células endoteliais (Flaumenhaft e col., 1993). Estas ações aparentemente díspares apoiam-se no papel fundamental do TGF- $\beta$  na apoptose das células endoteliais, mecanismo importante da atividade angiogénica (Ferrari e col., 2009). Este efeito apoptótico do TGF- $\beta$  sobre as células endoteliais é essencial à limitação da expansão da rede vascular em formação, inibindo a formação de vasos sanguíneos anómalos (Pollman e col., 1999), e ao controlo das funções celulares necessárias à morfogênese capilar (Choi e Ballerman, 1995).

No movimento dentário ortodôntico, a angiogênese das zonas sujeitas a compressão é crucial à reabsorção óssea. Após o movimento inicial do dente no interior do alvéolo, os osteoclastos com origem hematopoiética (Profitt e Fields, 2000) em monócitos percursoros (Wilcko e col., 2001) chegam à área afetada 12 horas depois, período que pode, no entanto, estender-se às 30 a 40 horas nos indivíduos mais jovens (Rygh e Moyers, 1988; Thilander e col., 2000). Os osteoclastos visíveis nas suas lacunas de Howship ao longo da superfície alveolar reabsorvem o tecido ósseo diretamente, aumentando o diâmetro do espaço periodontal e permitindo, assim, que o dente se movimente (Oppenheim, 1930; Waldo e Rothblatt, 1954). Este aumento de diâmetro é responsável pela alta atividade e diferenciação celulares e pela estimulação da proliferação das estruturas vasculares (Rygh e Moyers, 1988). Deste modo, o sistema vascular fornece muitas das células indiferenciadas que são, em parte, responsáveis pelas alterações associadas ao movimento dentário. O grande aporte sanguíneo à área em atividade é, conjuntamente com o aumento da permeabilidade vascular e formação do exsudato inflamatório, indício que a inflamação é uma componente importante da resposta biológica às forças ortodônticas (Davidovitch e col., 1997; Consolaro, 1999).

No que concerne à osteogênese, o TGF- $\beta$  abundante na matriz do tecido ósseo (Janssens e col., 2005) é um fator de crescimento osteogénico primordial à homeostase do tecido ósseo, recrutando células progenitoras dos osteoblastos, estimulando a sua proliferação e promovendo os estádios precoces de diferenciação associados à produção de proteínas da matriz extracelular (Janssens e col., 2005). Simultaneamente, ele suprime a proliferação de percursoros dos osteoclastos e aumenta a incidência da apoptose nos osteoclastos (Hughes e col., 1996). Muito embora o TGF- $\beta$  seja libertado e ativado durante a reabsorção óssea pelos osteoclastos (Oursler, 1994; Pfeilschifter e Mundy, 1987), não foi ainda possível determinar se a sua presença é produto direto da reabsorção da matriz óssea ou um subproduto da ação de outros fatores atuantes durante este processo (Pfeilschifter e Mundy, 1987).

Sabe-se que o TGF- $\beta$  *in vitro* induz a produção de grandes quantidades de tecido ósseo, das fibras periodontais a ele associadas; e promove a diferenciação, formação e mineralização de novo cemento radicular (Ripamonti e col., 2009; Li e col., 2015). Contudo, os efeitos do TGF- $\beta$  nas células da linha osteoblástica têm resultados diferenciados. Por um lado, os osteoblastos secretam TGF- $\beta$  que atua autocrinamente estimulando a proliferação dos pré-osteoblastos, mas inibindo a sua diferenciação, o que se traduz num menor número de osteoblastos produtores de proteínas da matriz extracelular, não havendo por isso formação de tecido ósseo (Harada e Rodan, 2003; Kang e col., 2005). Por outro lado, o TGF- $\beta$  afeta a diferenciação tardia da linha osteoblástica através da inibição ou bloqueio da mineralização óssea sem alterar o crescimento celular (Breen e col., 1994; Tally-Ronsholdt e col., 1995; Alliston e col., 2001; Kanaan e Kanaan, 2006), isto é, a apoptose dos osteoblastos é bloqueada pelo TGF- $\beta$ , permitindo que estes se diferenciem em osteócitos (Jilka e col., 1998; Bodine e col., 2005). Deste modo, o TGF- $\beta$  ao facultar a manifestação dos aspetos precoces da atividade dos osteoblastos, atrasando em parte os parâmetros bioquímicos associados à mineralização, permite o crescimento ósseo necessário à normalização do tecido antes que ocorra consolidação (Knoll e col., 2005). De salientar, no entanto, que os efeitos do TGF- $\beta$ , tanto *in vivo* como *in vitro*, dependem das condições experimentais e da metodologia empregue nos estudos, particularmente no que diz respeito às linhas celulares utilizadas, ao estágio de maturação das células, bem como da dose determinada, pelo que a literatura relata resultados contraditórios sobre os efeitos do TGF- $\beta$  na neoformação de tecido ósseo (Brady e col., 1998; Kanaan e Kanaan, 2006).

O aumento de expressão do TGF- $\beta$  detetado, no trabalho atual, junto à superfície alveolar do lado de pressão, onde uma remodelação óssea intensa estava a ocorrer, principalmente a partir das 72 horas após a aplicação do elastómero, é justificado pelo facto da expressão do TGF- $\beta$  em combinação com aplicação de cargas mecânicas alterar a atividade osteoblástica, estimulando a formação de novo osso. De facto, tanto a proliferação osteoblástica como a síntese de RNAm do TGF- $\beta$  pelos osteoblastos aumentam quando estes são sujeitos a estimulação mecânica (Neidlinger-Wilke e col., 1995; Zhuang e col., 1996; Cillio e col., 2000). Estes resultados estão de acordo com o facto de a partir das 72 horas, as observações histológicas demonstrarem que o tecido ósseo afetado estava em recuperação, sendo detetadas também linhas de reversão associadas à aposição óssea e áreas de ossificação intramembranosa.

O ligamento periodontal contém células mesenquimatosas indiferenciadas que se podem diferenciar em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos, participando na regeneração do tecido quando sujeito a agressão (Seo e col., 2004; Nanci e Somerman, 2013). Hosoya e colaboradores (2010) demonstraram que os osteoblastos que participam na regeneração do osso alveolar após transplantação dentária têm origem em células osteoprogenitoras presentes no ligamento periodontal. Também algumas das células do ligamento apresentam uma alta atividade de ALP (Ogata e col., 1995; Giannopoulou e col., 1996; Saito e col., 2002), produzem nódulos mineralizados (Cho e col., 1992; Mukai e col., 1993) e proteínas da matriz do tecido ósseo (Ramakrishnan e col., 1995; Nohu et al., 1997) em situações osteoindutoras (Hosoya e col., 2010). Presume-se que estas células sejam fibroblastos com um fenótipo similar ao dos osteoblastos, denominados osteoblasto-*like*, com alta atividade de ALP (Cho e col., 1992; Goseki e col., 1996; Liu e col., 1997), sendo considerados um fenótipo precursor quer de células do tecido ósseo, quer de cementoblastos (Cho e Garant, 2000) e que são produtores de fibras do cemento acelar extrínseco (Groeneveld e col., 1994; Groeneveld e col., 1995).

Deste modo, torna-se compreensível que, no estudo agora apresentado, adjacente à superfície alveolar do lado de pressão, tenham sido observadas no ligamento periodontal células com morfologia de fibroblastos, osteócitos e células com fenótipo de osteoblastos e osteoblastos-*like* a expressarem TGF- $\beta$ . Apesar dos fibroblastos secretarem TGF- $\beta$  que se deposita na matriz extracelular, uma das principais fontes do fator de crescimento são as células do tecido ósseo (Sporn e Roberts, 1993; Krishnan e Davidovitch, 2006). No entanto, não obstante no ligamento periodontal, os osteoblastos se diferenciarem também a partir de células

mesenquimatosas expostas ao TGF- $\beta$  (Garant, 2003b), só às 96 horas foram detetadas células perivasculares mesenquimatosas indiferenciadas a expressarem o fator de crescimento. Este facto indicia que, provavelmente, não terá sido esta a via principal pela qual o reservatório de osteoblastos necessário à osteogénese tenha sido restaurado. Os resultados obtidos sugerem que a diferenciação dos osteoblastos se deu a partir de células do ligamento periodontal, uma vez que estas é que continuamente expressaram TGF- $\beta$ .

Os resultados do presente estudo estão de acordo com o descrito por Davidovitch (1995) que detetou a imunorreatividade do TGF- $\beta$  em osteoblastos do osso alveolar durante o movimento ortodôntico experimental em gato. De referir, no entanto, que apesar das células com características osteoblasto-*like* expressarem TGF- $\beta$  e não expressarem citocinas pró-inflamatórias após estimulação por tensões mecânicas *in vitro*, o TGF- $\beta$  inibe o fenótipo osteoblasto-*like* nas células do ligamento periodontal (Brady e col., 1998).

Contudo, no que diz respeito à expressão do TGF- $\beta$  os resultados obtidos no trabalho atual não foram os espetáveis. Estudos experimentais *in vitro* demonstraram que os fibroblastos respondem ao estiramento sintetizando fatores osteogénicos pertencentes à superfamília do TGF- $\beta$  incluindo o próprio TGF- $\beta$  (Carano e Siciliani, 1999; Kimoto e col., 1999; Pinkerton e col., 2008). A regulação positiva da síntese do TGF- $\beta$  traduz-se no aumento do número de osteoblastos no ligamento periodontal no lado de tensão, dado que, tal como referido anteriormente, as células mesenquimatosas indiferenciadas respondem ao fator de crescimento diferenciando-se em osteoblastos (Garant, 2003b). Por outro lado, os fibroblastos respondem à compressão regulando positivamente a síntese de RANKL (Kanzanki e col., 2002; Yamaguchi e col., 2006; Krishnan e Davidovitch, 2009), o que se traduz no aumento do número de osteoclastos responsáveis pela reabsorção óssea. Efetivamente, na coordenação da remodelação óssea, osteoclastos, osteoblastos e fibroblastos comunicam através da via de sinalização RANKL-RANK-OPG já anteriormente mencionada na introdução (van Schepdael e col., 2013).

Estudos experimentais de movimento ortodôntico tanto em humano como em rato referiram a expressão do TGF- $\beta$  em ambos os lados do movimento, sendo esta mais intensa no lado de tensão (Nagai e col., 1999; Wang e col., 2000; Garlet e col., 2007). De referir que a expressão tanto o TGF- $\beta$  como o seu recetor são induzidas pelo movimento dentário, sendo identificadas em osteoblastos e osteoclastos responsáveis pela remodelação adaptativa do osso alveolar. Particularmente notório é o aumento de expressão do RNAm do TGF- $\beta$  no osso alveolar do lado do movimento (Nagai e col., 1999). Nestas circunstâncias, no presente estudo era esperado que também houvesse expressão do TGF- $\beta$  no lado de tensão, o que não se verificou. Os resultados obtidos sugerem que neste modelo experimental, a sinalização do mecanismo da osteogénese no lado de pressão poderá ser efetuada pelo TGF- $\beta$ , enquanto que no lado de tensão, não será este fator de crescimento o mediador do processo, contrariamente ao que tem vindo a ser descrito na literatura.

Há que ter em consideração também que o crescimento do tecido ósseo ocorre porque o TGF- $\beta$  secretado pelos osteoblastos promove o aumento da síntese de proteínas da matriz do tecido ósseo como o Colagénio tipo I, a Osteopontina e a Proteína Gla da matriz (Sowa e col., 2002). Das R-Smads, a Smad3 é aquela que mimetiza os efeitos do TGF- $\beta$ , uma vez que a sua sobreexpressão se traduz também no aumento de produção destas proteínas (Sowa e col., 2002). Mas, contrariamente ao TGF- $\beta$ , a Smad3 regula positivamente a expressão da ALP e estimula a mineralização do tecido ósseo durante a osteogénese (Sowa e col., 2002). Paradoxalmente, o TGF- $\beta$  sinalizando através da Smad3 inibe a expressão da Osteocalcina e outros marcadores da atividade osteoblástica, bem como a diferenciação osteoblástica através da regulação negativa da expressão dos genes alvo do Runx2 (Kang e col., 2005).

O facto da Smad3 não se encontrar expressa em nenhum dos animais dos grupos experimentais do estudo atual demonstra que a osteogénese mediada pelo TGF- $\beta$  não é sinalizada através desta proteína. Deste modo, os resultados indiciam que os efeitos biológicos do fator de crescimento concorrem no sentido da

produção das proteínas da matriz extracelular e consequente aumento de tecido ósseo, havendo atraso na apoptose dos osteoblastos e mineralização do tecido ósseo em formação.

De referir que a sinalização do TGF- $\beta$  é crítica na regulação da osteoclastogénese induzida pelo RANKL. Nesta via de sinalização, a ativação do TRAF6, um fator associado ao recetor do TNF essencial na inflamação, é mediada pela Smad3 (Yasui e col., 2011). Deste modo, na presente investigação, o facto da Smad3 não se encontrar expressa nas áreas associadas à reabsorção óssea, particularmente no lado de pressão onde ela foi mais intensa, permite supor também que a Smad3 não seja a proteína mediadora da via de sinalização do TGF- $\beta$  neste processo.

No estudo agora apresentado, a Smad2 encontrou-se sistematicamente e intensamente expressa em todos os grupos experimentais, tanto do lado de pressão como no lado de tensão, sendo os osteoblastos nos grupos T03 e T04, às 72 e 96 horas, as células que apresentaram maior expressão da proteína. Contudo, o facto das células não expressarem simultaneamente Smad2 e TGF- $\beta$ , questiona a participação de ambas as R-Smads, Smad2 e Smad3, nos processos associados à remodelação do tecido ósseo neste modelo experimental. Tal facto sugere que a sinalização do TGF- $\beta$  na osteogénese é independente de ambas as Smads, ocorrendo não pela via canónica, mas sim por uma via de sinalização não canónica como a p38 MAPK que ativa o gene *RUNX2* que controla a diferenciação das células mesenquimatosas precursoras. Através desta via não canónica, o TGF- $\beta$  além de promover a proliferação das células progenitoras, a sua diferenciação precoce e o seu comprometimento à linha celular osteoblástica, induz também a expressão do Colagénio tipo I (Chen e col., 2012).

No movimento ortodôntico, a transdução da força aplicada pelas células dos tecidos periodontais desencadeia uma resposta biológica que tem sido descrita como uma inflamação asséptica, uma vez que é mediada por uma variedade de citocinas inflamatórias e não representa uma condição patológica (Meikle, 2006). Contrariamente à inflamação crónica “pura”, na qual a persistência do estímulo nocivo mantém respostas inflamatórias de longa duração, resultando na lesão dos tecidos, a expressão de mediadores inflamatórios após a aplicação de forças ortodônticas é transiente e essencial ao movimento dentário, sendo as drogas anti-inflamatórias capazes de bloquearem o movimento dentário (Walker e Buring, 2001).

O facto de no presente estudo, não terem sido observados neutrófilos em nenhuma das secções estudadas dos diferentes grupos experimentais, confirma que a inflamação aguda foi asséptica e terá eventualmente antecedido o primeiro tempo experimental, as 24 horas, tendo o processo inflamatório evoluído rapidamente para uma inflamação crónica asséptica e transitória que caminhava no sentido da reparação do sistema afetado (Krishnan & Davidovitch, 2006; Andrade e col., 2012).

Neste trabalho, o recurso ao método de Waldo e Rothblatt para indução do movimento ortodôntico experimental revelou-se fundamental. Com este método, contrariamente ao mencionado anteriormente (Macapanpan, 1954; Hadj-Salem, 1971), o risco de se lesarem os tecidos periodontais foi mínimo. Deste modo, evitou-se a criação de uma reação inflamatória de origem bacteriana que decorresse com um infiltrado inflamatório rico em PMNs que potencialmente mascarasse a reação inflamatória produzida unicamente pela movimentação dentária. A presença circunstancial de PMNs numa das secções analisadas poderá estar presumivelmente associada a qualquer infeção que o animal em causa teria, e não propriamente ao processo inflamatório associado ao movimento dentário ortodôntico que estava a decorrer.

Uma inflamação crónica asséptica é considerada predominantemente proliferativa em relação aos fibroblastos, células endoteliais, osteoblastos, células dos espaços medulares e células mononucleares como linfócitos, macrófagos e plasmócitos (Johnson & Ziff, 1976; Bartold e Narayanan, 1998; Krishnan & Davidovitch, 2006; Kumar e col., 2012). Deste modo, uma inflamação crónica processa-se com uma destruição tecidual induzida largamente por produtos secretados por estas células inflamatórias e com um desejável mecanismo de remodelação e regeneração que envolve angiogénese e produção de matriz extracelular (Kumar e col., 2012).

Contudo, no trabalho atual, não foi observado infiltrado inflamatório em nenhum dos animais dos grupos teste, facto não concordante com o proposto por Vandevska-Radunovic e colaboradores (1997). De acordo com os autores, o movimento ortodôntico experimental induz, na fase inflamatória inicial e nos processos tecidulares regenerativos posteriores, o recrutamento para esta região principalmente de leucócitos mononucleares da linha monocítica-macrofágica, sendo o recrutamento de linfócitos e granulócitos menos significativo. Do mesmo modo, os resultados obtidos não são concordantes com o descrito por Consolaro (1999), segundo o qual os macrófagos e outras células mononucleares chegariam ao local lesado 8 a 12 horas depois da aplicação da força ortodôntica, tornando-se as células predominantes ao fim de cinco dias.

Apesar dos macrófagos, linfócitos e plasmócitos serem integrantes dos processos de inflamação crónica, tal como mencionado anteriormente, a sua presença neste processo inflamatório asséptico é de questionar, particularmente porque dos linfócitos, tanto as células T com fenótipo *T helper 2* (Th2) como as células B participam na imunidade humoral (Kimura e col., 2010). Neste processo, as células B continuamente estimuladas ao interagirem com antigénios diferenciam-se em plasmócitos, células fundamentais à proteção imune a longo prazo, que passam a sintetizar anticorpos (Bartold & Narayanan, 1998; Chu e col., 2014).

Na resolução de um processo inflamatório, as células recrutadas que proliferaram durante as fase ativas do processo, mas que entretanto entraram em processo de apoptose ou que já não são necessárias, têm que ser removidas do microambiente. Neste processo, os macrófagos são geralmente os agentes principais (Saville e col., 2002). Efetivamente, a presença dos macrófagos é necessária à remodelação tecidual, uma vez que eles efetuam a endocitose de corpos estranhos e detritos necróticos, e participam também na inflamação através da secreção de citocinas (Leeper-Woodford e Detmer, 1999), fatores de crescimento, prostaglandinas, interferão, elastase, ativador do plasminogénio, colagenase e os componentes C3 e C5 do complemento (Nathan, 1987).

Na fase de resolução de uma inflamação, o subtipo M2, é particularmente importante. Ele suprime as respostas imunes, regulando positivamente a expressão de mediadores anti-inflamatórios como a IL-10 (Garant, 2003c; Condeelis e Pollard, 2006; Solinas e col., 2009; Kimura e col., 2010; Murray e Wynn, 2011) e TGF- $\beta$  (Huynh e col., 2002); e as quimiocinas por eles secretadas promovem o recrutamento de leucócitos envolvidos na reparação e remodelação dos tecidos lesados (Sica e col., 2008). Até recentemente, o foco da investigação sobre inflamação esteve centrado nas interações celulares entre os linfócitos, macrófagos e células dendríticas, todas elas geradoras de respostas antigénio-específicas (Smith e col., 1997). Contudo, muitos dos estímulos flogísticos não são de origem infecciosa, pelo que a resposta inflamatória poderá ter como participantes células de origem mesenquimatosa (Buckley e col., 2001). No presente estudo, devido ao facto do processo inflamatório desencadeado ser asséptico, sem a participação de agentes infecciosos, os resultados obtidos parecem indicar que os fibroblastos sejam células efetoras importantes na resposta inflamatória neste modelo experimental.

O sistema que tem como intervenientes na resposta inflamatória os fibroblastos garante, através da produção de quimiocinas e de matriz extracelular, que a qualidade do infiltrado inflamatório é o ideal à resolução da inflamação ou à transição suave de uma inflamação aguda para uma imunidade adaptativa na presença de agentes infecciosos (Buckley e col., 2001). De igual modo, a expressão temporal e espacial do TGF- $\beta$  pelos fibroblastos pode determinar o padrão e a persistência dos infiltrados inflamatórios, sendo os fibroblastos quando fenotipicamente alterados, as células responsáveis pela conversão da resposta imunológica numa reação inflamatória crónica (Buckley e col., 2001).

Na inflamação, os fibroblastos atuam conjuntamente com os macrófagos como sentinelas do sistema imune, colaborando também na fagocitose de neutrófilos apoptóticos (Smith e col., 1997; Akgul e col., 2001). Os fibroblastos não são participantes passivos, pelo contrário, eles definem ativamente a estrutura do microambiente local, condicionam a secreção das moléculas intervenientes neste processo como citocinas, quimiocinas e

leucotrienos como a PGE<sub>2</sub> e modelam a atividade quer das células imunes de origem hematopoiética quer das células locais (Buckley e col., 2001). De facto, os fibroblastos são células capazes de sintetizar e secretar um grande número de moléculas como fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, dentre os quais o TGF- $\beta$  tem um papel primordial na proliferação e diferenciação celular fibroblástica (Nayak e col., 2013). Uma vez que perante uma agressão tecidual, se pretende que o processo de reparação ocorra fundamentalmente por regeneração e não por cicatrização, permitindo que a biologia e a fisiologia do tecido agredido não sejam comprometidas (Atala e col., 2010), o envolvimento dos fibroblastos quer na cascata de inflamação quer na adaptação e remodelação dos tecidos por esta afetados torna-se vital. Neste processo, a presença de TGF- $\beta$  no microambiente inflamatório, estimula as células inflamatórias e os fibroblastos presentes a secretarem mais TGF- $\beta$  e outras citocinas; perpetuando a proliferação da população de fibroblastos, a síntese de matriz extracelular e a angiogénese (Merwin e col., 1990; Sporn e Roberts, 1993). Estas características são elementos importantes na resposta inflamatória, nomeadamente na sua resolução, na qual o TGF- $\beta$  atua como citocina anti-inflamatória regulando negativamente o processo inflamatório e mediando positivamente a remodelação e adaptação da matriz extracelular que foi sujeita a uma agressão (Aoki e col., 2005).

O TGF- $\beta$  apesar de induzir *in vitro* a resposta quimioatratante mais potente para os monócitos circulantes (Wahl e col., 1987; Wiseman e col., 1988), é também um potente imunossupressor fisiológico nos mamíferos, inibindo a função do sistema imune, nomeadamente através da supressão da capacidade dos monócitos/macrófagos secretarem citocinas inflamatórias como o IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Maltman e col., 1996; Li e col., 2014). Deste modo, o TGF- $\beta$  é considerado uma citocina anti-mitogénica das células imunes (Massagué e col., 2000). Tal como a IL-10 é um regulador importante da homeostase do sistema imune e cuja desregulação pode produzir ou agravar patologias como a doença auto-imune (Monteleone e col., 2001).

A função da Smad2 no sistema imune não tem sido alvo de investigação frequente em modelos experimentais animais, devido à alta mortalidade embrionária que os animais deficientes em Smad2 apresentam (Takimoto e col., 2010). Esta R-Smad tem sido, no entanto, objeto de estudo em modelos experimentais de patologias inflamatórias pulmonares, onde se tem verificado que valores de expressão baixos estão presentes em pulmões saudáveis, facto que poderá refletir um baixo nível inflamatório. Em contraste, valores elevados da expressão da Smad2 estão presentes em células inflamatórias que migram para as áreas afetadas e são sinal que a ativação da via de sinalização do TGF- $\beta$  está associada ao desenvolvimento de inflamações respiratórias (Rosendahl e col., 2001; Sagara e col., 2002; Takimoto e col., 2010).

Na investigação presentemente realizada sobre o movimento ortodôntico, a Smad2 esteve sempre expressa em todos os grupos experimentais, tanto do lado de pressão como do lado de tensão, apesar da sua expressão ter apresentado diferentes intensidades nas populações celulares analisadas. Com base nos resultados dos estudos experimentais em patologias pulmonares, poder-se-ia supor que a marcação intensa da Smad2 no modelo experimental atualmente estudado indicaria uma forte resposta inflamatória à aplicação de força ortodôntica. Contudo, tal como mencionado anteriormente, não se observou a expressão simultânea da Smad3 em nenhum dos animais estudados. A Smad3 é necessária à manutenção das respostas imunossupressoras normais do TGF- $\beta$  (Song e col., 2009; Dai e col., 2015) e a sua ausência de expressão traduz-se na diminuição da quimiotaxia para os monócitos e neutrófilos mediada pelo TGF- $\beta$ , bem como numa regeneração mais rápida dos tecidos (Ashcroft e col., 1999; Datto e col., 1999; Yang e col., 1999; Werner e Grose, 2003).

As diferenças de expressão das duas R-Smads poderão estar relacionadas com o facto de alguns promotores que respondem ao TGF- $\beta$  poderem ser Smad2-independentes (von Gersdorff e col., 2000) ou Smad3-independentes (Ashcroft e col., 1999), em algumas situações elas terem funções antagónicas (Nagarajan e col., 1999), poderem ser redundantes funcionalmente (Takimoto e col., 2010), induzirem as respetivas expressões (Li e col., 1998) ou os seus genes serem regulados diferencialmente ao nível da transcrição (Rosendahl e col., 2001).

Perante os resultados obtidos neste estudo, é possível inferir que a chamada de células inflamatórias para o local lesado mediada pelo TGF- $\beta$  se encontrou diminuída. Em ambos os lados do movimento, foi patente que o sistema respondeu rapidamente no sentido da reparação, sendo flagrante o aumento do número de células. No lado de pressão, onde os efeitos nocivos da força aplicada foram mais extensos, havendo reabsorção óssea intensa e necrose asséptica com a consequente hialinização, o fator de crescimento encontrou-se sempre expresso. Estes dados tomados em conjunto possibilitam pressupor que, no periodonto lesado, o processo inflamatório terá decorrido com uma magnitude reduzida e que já às 24 horas caminhava no sentido da resolução. De igual modo, o facto da expressão do TGF- $\beta$  e dos seus mediadores R-Smads não ser sobreponível, indicia que não há correlação entre as proteínas e que, por tal, o TGF- $\beta$  não atua através da sua via de sinalização canónica.

Convém, no entanto, relembrar que a capacidade do TGF- $\beta$  induzir eventos imunossupressores ou inflamatórios depende do microambiente, nomeadamente da presença de outras citocinas que regulam a sua função, e cujo papel deverá ser eventualmente analisado quando se estuda uma determinada patologia (Chawla e col., 2013; Kim e col., 2013; Marra e Tacke, 2014).

A IL-10 é a mais importante citocina anti-inflamatória encontrada na resposta imunitária, sendo um regulador chave do sistema imunitário ao restringir a resposta inflamatória que doutro modo poderia causar danos severos (Sanjabi e col., 2009). Assim, esta citocina é crucial à homeostase do sistema imune. Durante processos infecciosos agudos, o bloqueio da sua secreção pode resultar numa patologia mais grave ou mesmo na morte do organismo (Couper e col., 2008), mas, por outro lado, a secreção de altos níveis de IL-10 está associada à persistência de infeções crónicas (Moore e col., 2001). Além de ser produzida por macrófagos/monócitos ativados e mastócitos, ela também é secretada por células Th2 ativadas e células B estimuladas, induzindo autocrinamente a sua diferenciação e proliferação (Skinnider e Mak, 2002), pelo que a regulação positiva desta citocina está associada ao aumento da sobrevivência numa grande variedade de doenças inflamatórias (Cox, 1996; Palaniyandi e col., 2004). A IL-10 é uma reguladora negativa da função de fagocitose das células mononucleares e, similarmente ao TGF- $\beta$ , inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  (Chernoff e col., 1999), regula positivamente a expressão da OPG e regula negativamente a expressão do RANKL, contribuindo, deste modo, para a inibição da reabsorção óssea (Ren e Vissink, 2008). Também tal como acontece com o TGF- $\beta$ , as respostas biológicas à IL-10 dependem do tipo de células alvo (Sanjabi e col., 2009).

No trabalho aqui apresentado, não houve diferenças na expressão da IL-10 em ambos os lados do movimento, tendo esta sido consistentemente detetada, com uma expressão moderada, quer no grupo de controlo quer nos grupos de experimentação ativa, às 24, 48, 72 e 96 horas. Estes resultados não estão de acordo com os de Garlet e colaboradores (2007, 2008) que em estudos experimentais de movimento ortodôntico em humano determinaram que a IL-10 tem uma expressão mais significativa no lado de tensão do que no lado de pressão. Os resultados obtidos também não são concordantes com os de Long e colaboradores (2001), segundo os quais, forças de tensão de baixa intensidade induzem a expressão de IL-10 nas células do ligamento periodontal.

Os resultados obtidos neste estudo relativamente à IL-10 justificam-se à luz do facto de no movimento dentário ortodôntico, a transdução das forças de tensão e pressão produzirem diferentes padrões de remodelação tecidual. A força de pressão produz compressão do ligamento e induz as consequentes perdas celulares, enquanto no lado oposto, a força de tensão estimula o aumento da atividade celular e a deposição de fibras (Azuma, 1970; Moraes e col., 1999; Krishnan & Davidovitch, 2006). Deste modo, no lado de pressão, os tecidos periodontais estão sujeitos a uma agressão acentuada, levando a ocorrência de maiores efeitos deletérios como a necrose asséptica, a reabsorção óssea extensa e a diminuição da população celular em zonas de hialinização. Os cementoblastos sujeitos a forças compressivas têm limitada a sua capacidade de expressarem proteínas associadas com a cementogénese (Diercke e col., 2012) e a reabsorção óssea tem que ser restringida antes que se torne incontrolável. Torna-se compreensível que, neste lado do movimento, a

necessidade de repôr os tecidos e as populações celulares perdidas seja premente. Há que permitir ao sistema agredido recuperar, deixando que a inflamação alcance a resolução. A indução de osteoblastos e osteoblastos-like secretores de IL-10 em zonas de destruição óssea promove a remodelação do tecido, a expressão de genes específicos dos osteoblastos, a supressão da indução da osteoclastogénese pelo RANKL e a produção maciça de matriz do tecido ósseo que é mineralizada por fosfato de cálcio *in vitro* e *in vivo* (Fujioka e col., 2015). Desta maneira, a IL-10 atua de um modo similar ao TGF- $\beta$ . Assim se entende que, neste estudo efetuado em modelo animal, a expressão da citocina tenha sido detetada com maior intensidade nas células do tecido ósseo e em cementoblastos ativos, não só no lado de tensão tal como nos estudos referidos, mas também no lado de pressão. Apesar de expressa em menor intensidade pelos fibroblastos ativos intervenientes no processo inflamatório, no que concerne às células do tecido ósseo, a IL-10 foi expressa por osteócitos logo às 24 horas, por osteoblastos adjacentes à superfície alveolar a partir das 48 horas como resposta à reabsorção óssea (lado de pressão) e ao estiramento (lado de tensão) e, paradigmaticamente, às 72 e 96 horas também em áreas de ossificação intramembranosa no lado de pressão. De salientar que tanto a remodelação por aposição óssea como a ossificação intramembranosa são mecanismos necessários à reposição e manutenção do tecido ósseo.

Apesar do TGF- $\beta$  e da IL-10 atuarem independentemente um do outro, eles partilham efeitos anti-inflamatórios (Bogdan e col., 1992; Li e col., 2014). Estudos anteriores demonstraram que o TGF- $\beta$  atua mais lentamente, enquanto a IL-10 tem um efeito mais rápido na inibição da expressão das citocinas pró-inflamatórias, mas a sua combinação tem efeitos anti-inflamatórios mais potentes do que cada uma delas atuando isoladamente (Li e col., 2014).

Dentro deste contexto seria de esperar que, no trabalho atual, a expressão do TGF- $\beta$  fosse sobreponível à da IL-10, o que não se verificou. Ambas as citocinas foram reguladas positivamente como resposta às forças de pressão, sendo expressas nos grupos teste não só pelos cementoblastos e pelos fibroblastos, mas também pelos osteoblastos e osteoblastos-like presentes em áreas de remodelação óssea intensa que decorreu inclusivamente com ossificação intramembranosa. Mas, tal como referido anteriormente, o TGF- $\beta$  não se expressou no lado de tensão, ele apenas se expressou consistentemente nos tecidos sujeitos à força de pressão, quer no grupo C01 de controlo quer nos grupos teste às 24, 48, 72 e 96 horas, tendo a sua expressão sido diferencial nas diferentes populações celulares presentes. Estes dados implicam que apesar do TGF- $\beta$  e da IL-10 serem citocinas anti-inflamatórias que em algumas situações cooperam, neste modelo experimental não há correlação na sua ação, atuando ambas independentemente.

Na cavidade oral, o TGF- $\beta$  é um mediador fundamental na reparação de lesões (Yang e col., 1996), acelerando o processo ao nível tanto dos tecidos duros como dos moles (Tyler e col., 1999). Assim, também aqui o TGF- $\beta$  atua como citocina anti-inflamatória, suprimindo os efeitos das citocinas pró-inflamatórias e mediando a reparação e reconstrução do ligamento periodontal (Terranova & Wikesjö, 1987). As células do ligamento periodontal respondem ao TGF- $\beta$  através do aumento da síntese de proteínas e de ARN *in vivo* (Mailhot e col., 1995), sendo detetada a presença, nomeadamente, do seu RNAm em cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos no periodonto de molares de rato em erupção (Gao e col., 1998). Também, tal como já foi referido, estudos experimentais de movimento dentário ortodôntico, tanto em humano como em rato, referiram que o TGF- $\beta$  se encontra expresso em ambos os lados do movimento, sendo, contudo, esta expressão mais intensa no lado de tensão (Nagai e col., 1999; Wang e col., 2000; Garlet e col., 2007). De facto, a sua deteção no fluido crevicular de humanos demonstra que o TGF- $\beta$  é produto das respostas biológicas à transdução das forças ortodônticas, sendo a sua expressão significativa, rápida e transitória 24 horas após a aplicação da força. No entanto, o TGF- $\beta$  manter-se-à expresso ao fim de uma semana, desde que a força se mantenha ativa (Uematso e col., 1996b).

Se a expressão do TGF- $\beta$  é importante na osteogénese, regulando positivamente a diferenciação dos osteoblastos, não é possível esquecer que durante um processo de remodelação e regeneração de um tecido

conjuntivo como o ligamento periodontal, o TGF- $\beta$  regula a atividade dos fibroblastos induzindo a formação de tecido conjuntivo e Colagénio e bloqueando a destruição da matriz extracelular recém-sintetizada (Sporn e Roberts, 1993; Yan e col., 2009).

Muitas células adultas diferenciadas podem ser agrupadas em famílias cujos membros estão intimamente relacionados quer pela sua origem quer pelo seu fenótipo. Uma destas famílias é constituída pelas células dos tecidos conjuntivos, fibroblastos, células cartilaginosas e células do tecido ósseo que são interconvertíveis, estão particularmente especializadas na secreção de matriz extracelular e no seu conjunto são responsáveis pelo estabelecimento da estrutura arquitectónica do organismo (Alberts e col., 2002). Apesar de nem todos os fibroblastos terem uma origem mesenquimatosas, nomeadamente os fibroblastos da órbita desenvolvem-se a partir da ectoderme neural (Smith e col., 1997), eles são um grupo celular extremamente versátil, capaz de se diferenciar não só em células cartilaginosas e células dos tecidos ósseos, mas também em células adiposas e células da musculatura lisa (Alberts e col., 2002).

A sinalização efetuada pelos membros da superfamília do TGF- $\beta$  é, assim, um importante mecanismo controlador que determina a seleção da linhagem celular e a progressão da diferenciação das populações celulares com origem em células mesenquimatosas. Nestas circunstâncias, a atividade do TGF- $\beta$ , dos seus recetores e dos seus mediadores Smad é regulada espacial e temporalmente durante a diferenciação das células mesenquimatosas (Derynck e col., 2007).

Este facto é particularmente relevante, uma vez que o ligamento periodontal é um tecido mesenquimatoso pluripotente com uma população celular heterogénea, contendo osteoblastos, osteoclastos, cementoblastos, macrófagos e células mesenquimatosas indiferenciadas (Norton e col., 1992; Lekic e McCulloch, 1996), no qual os fibroblastos são predominantes (Beertsen e col., 2000). Aqui, os fibroblastos constroem a estrutura de suporte essencial à manutenção da capacidade de reparação e da integridade do tecido (Smith e col., 1997), sendo considerados as células mesenquimatosas que contêm a maquinaria necessária à produção de Colagénios e outros componentes, ao mesmo tempo que participam na degradação dos constituintes da matriz extracelular (Saito e col., 2002).

No caso particular do movimento dentário ortodôntico, as células do ligamento periodontal são fundamentais na elaboração das respostas adaptativas à aplicação de cargas mecânicas aos dentes, mas os processos de reparação são complicados pela grande diversidade dos tipos celulares aqui presentes. Isto implica que a regeneração do ligamento periodontal dependa da atuação de outras células para além dos fibroblastos, dos mecanismos de *crosstalk* entre células da mesma linhagem em diferentes estádios de diferenciação (Hughes e McCulloch, 1991) e de células de linhagens diferentes envolvidas no anabolismo e no catabolismo do mesmo tecido (Weivoda e col., 2015). Estas interações ocorrem de um modo similar às do tecido ósseo, no qual a reabsorção e a formação óssea são processos intimamente ligados e a comunicação entre as células da linhagem osteoclástica e da linhagem osteoblástica dá-se através de contactos célula-a-célula, de fatores biológicos atuando autócrina e paracrinamente e de interações entre as células e a matriz extracelular (Matsuo e Irie, 2008).

Há que ter em consideração que, além da remodelação do tecido ósseo, a remodelação do tecido conjuntivo ligamentar é um processo inerente à regeneração tecidual associada ao movimento dentário ortodôntico. No lado de pressão, o sistema de fibras comprimido é reconstruído e reorientado após a quase completa destruição dos feixes de fibras mais antigas, o que implica a formação de novos elementos fibrilares e rearranjo do substrato. Neste processo, os fibroblastos são as células responsáveis pela síntese de novas fibras e de substância fundamental, de um modo muito semelhante ao de reparação por cicatrização dos tecidos (Scharffetter e col., 1989), mas também pela degradação do tecido afetado, ocorrendo ambos os mecanismos em simultâneo (Ten Cate e col., 1976). No lado de tensão, a remodelação do sistema de fibras estirado é efetuada por alterações das fibras originais, mecanismo no qual, os macrófagos contribuem para a degradação

do Colagénio, não por fagocitose, mas por modelação do crescimento e função dos fibroblastos. Aqui, as fibras não são destruídas tal como no lado de pressão, apesar da sua remodelação envolver também a reabsorção e deposição de novo Colagénio (Rygh e Moyers, 1988).

Vários mecanismos, entre os quais se incluem a proliferação, diferenciação e migração celular, são ativados para reposição da população de fibroblastos reduzida em áreas de lesão tecidual. A resposta dos fibroblastos durante um processo inflamatório passa por diferentes etapas: proliferação, diferenciação e síntese de Colagénio. A proliferação celular é um mecanismo intimamente relacionado com o ciclo celular, cuja controlo é efetuado uma série de proteínas altamente conservadas como as cinases ciclino-dependentes (CDKs) e grupos de proteínas ativadoras e inibidoras. O PCNA é uma proteína presente no compartimento proliferativo das células normais e como tal está associado ao ciclo celular. Tendo sido inicialmente identificado como a proteína auxiliar da ADN polimerase  $\delta$ , que além de ser a principal replicase do ADN está também ativa em diversas vias de reparação do ADN lesado (Bravo e col., 1987). Consequentemente, o PCNA é apenas sintetizado e expresso pelas células proliferativas (Wei e col., 2003), pelo que a sua concentração celular está diretamente relacionada com o estado proliferativo das células em questão (Ando e col., 2001; Wei e col., 2003). Uma vez que é um comunicador celular, o PCNA participa ativamente no metabolismo do ADN ao atuar como mediador entre este e as diferentes proteínas envolvidas no controlo do ciclo celular (Maga e Hubscher, 2003; Lu e col., 2002), sendo essencial às múltiplas interações proteína-proteína envolvidas na replicação, reparação e recombinação do ADN. O PCNA participa ainda ativamente na regulação do ciclo celular, na apoptose e transcrição, de modo a que todos estes processos se tornem altamente eficazes (Maga e Hubscher, 2003). Contudo, como o PCNA está implicado nestes diversos mecanismos associados à síntese do ADN, o aumento da sua expressão pelas células proliferativas não é indicativo da quantidade de ADN que está a ser sintetizado, ele reflete apenas a intensidade dos processos que estão a ocorrer (Maga e Hubscher, 2003).

No ligamento periodontal sujeito a forças ortodônticas, mesmo no lado de pressão em zonas onde ocorreu hialinização com perdas celulares, o sistema tende a responder rapidamente, nomeadamente através da proliferação de celular. As forças ortodônticas atuam como estímulo mitogénico forçando os fibroblastos quiescentes a iniciarem o ciclo celular (Macapanpan e col., 1954; Kyomen e Tanne, 1997; Mabuchi e col., 2002; Maló e col., 2014). O trabalho presentemente realizado vem confirmar que a proliferação celular é um dos mecanismos de resposta à agressão constituída pela aplicação de uma força ortodôntica, tendo sido detetada a expressão de PCNA em células do ligamento periodontal com morfologia de cementoblastos-like e fibroblastos logo às 24 horas. Os dados obtidos são somente em parte concordantes com o relatado anteriormente por Maló e colaboradores (2014), segundo os quais a expressão do PCNA é igual em ambos os lados do movimento e atinge o seu máximo às 48 horas. No presente estudo, a expressão do PCNA atingiu sua maior intensidade às 72 horas no lado de pressão, altura em que a proliferação detetada no lado de tensão já apresentava uma menor magnitude, com a presença de uma menor densidade de células marcadas. Às 96 horas, altura em que os tecidos periodontais se encontravam praticamente regenerados, surgindo histologicamente com um aspeto muito próximo do normal, a expressão do PCNA foi apenas detetada numa pequena população celular principalmente no lado do movimento sujeito a forças de pressão. Este facto parece confirmar que o processo de proliferação é rápido e ocorre nas primeiras 72 horas. A diferença quer nos mecanismos de produção de força quer na idade dos animais experimentais poderá estar na base da discrepância de resultados. Aparentemente em animais jovens, como os utilizados no trabalho atual, apesar do ligamento periodontal ser sujeito à aplicação de uma força de grande intensidade (Hadj-Salem, 1971), a resposta proliferativa é intensa e mais prologada no lado de pressão. Estes dados, com algumas limitações, são sobreponíveis aos de Kyomen e Tanne (1997) que detetaram também uma proliferação mais prolongada no lado de pressão em indivíduos jovens sujeitos a forças ortodônticas leves. Também na presente investigação, a expressão do PCNA observada

com maior intensidade no lado do movimento sujeito a forças de pressão parece indiciar que os tecidos periodontais sujeitos a uma agressão mais acentuada, que decorre com maiores efeitos perniciosos, respondem mais intensamente. Esta resposta poderá estar relacionada com a tentativa constante do sistema biológico agredido reestabelecer a normalidade, neste caso através da proliferação celular.

O TGF- $\beta$  promove *in vitro* a proliferação celular dos fibroblastos do ligamento periodontal de um modo dependente do tempo e da dose (Silverio-Ruiz e col., 2007). Mas os seus efeitos na expressão de genes como o  $\alpha$ -SMA ou COL-1 (Colagénio tipo I) parece estar dependente do tipo de célula, do seu estágio de diferenciação e das condições experimentais (Fujii e col., 2010). O TGF- $\beta$  é especificamente importante na manutenção das características fibroblásticas do ligamento sob condições fisiológicas através da perservação da expressão destes genes nas células ligamentares (Fujii e col., 2010). Contudo, a estimulação por mais de 24 horas das células do ligamento pelo TGF- $\beta$  não regula positivamente a expressão do seu gene, estando esta provavelmente dependente de outros fatores moleculares presentes no ligamento periodontal (Brady e col., 1998).

Neste contexto, esperar-se-ia, no presente trabalho, a expressão do TGF- $\beta$  nos fibroblastos presentes no lado de tensão do movimento, o que não ocorreu. Também relativamente a esta população celular do ligamento periodontal, o TGF- $\beta$  apenas apresentou expressão no lado de pressão a partir das 24 horas, confirmando que neste modelo experimental, o fator de crescimento é apenas ativado nos tecidos periodontais sujeitos a compressão.

Tal como referido anteriormente, a experimentação animal determinou que a Smad2 e a Smad3 têm tanto efeitos sobreponíveis como efeitos distintos na sinalização do TGF- $\beta$ , dependendo dos genes alvos e do contexto celular. Enquanto que a ausência da Smad2 está associada à letalidade do embrião devido à inexistência do estabelecimento do eixo ântero-posterior, da gastrulação e da formação da mesoderme (Nomura e Li, 1998; Weinstein e col., 1998), eventos controlados por sinais Smad2-dependentes emanados da endoderme (Heyer e col., 1999; Waldrip e col., 1999); os ratos que não expressam Smad3 sobrevivem, mas têm um sistema imune deficiente e morrem por inflamação crónica de vários órgãos devido à falta de resposta das células T deficientes em Smad3 ou devido a uma resposta quimiotática diminuída dos neutrófilos deficientes em Smad3 ao TGF- $\beta$  (Datto e col., 1999; Yang e col., 1999). Deste modo, enquanto a Smad2 é imprescindível durante a embriogénese, a Smad3 tem um papel significativo como mediadora dos efeitos biológicos do TGF- $\beta$  nos tecidos adultos, participando também nos eventos patológicos mediados por este (Ashcroft e col., 1999; Datto e col., 1999).

Do mesmo modo que para o sistema imune, o estudo do papel da Smad2 na mediação dos efeitos biológicos do TGF- $\beta$  não tem sido substancial devido à alta mortalidade embrionária que os animais deficientes em Smad2 têm. No entanto, estudos recentes implicaram a diminuição da expressão da Smad2 no desenvolvimento de tumores como carcinoma gástrico, glioma, carcinoma da mama, cancro colorrectal, cancro do pulmão e o carcinoma de células escamosas do esófago (Shinto e col., 2010; Wu e col., 2012; Chen e col., 2014). De facto, verificou-se que fibroblastos Smad2 *Knockdown* sofrem proliferação *in vitro*, enquanto que *in vivo* a deleção do gene da Smad2 em células tumorais induz um fenótipo mais agressivo do que aquele observado nos controlos, presumindo-se que a diminuição da expressão da Smad2 esteja associada à angiogénese e à progressão dos tumores (Nakagawa e col., 2004). Mas apesar da sua expressão estar aumentada nos fibroblastos presentes nos processos queloidais nos quais há um excesso de produção de componentes da matriz extracelular como elastina, fibronectina e Colagénio tipo I e III (Kim e col., 2013), estudos efetuados em fibroblastos embrionários demonstraram que é a Smad3 e não a Smad2 o mediador fundamental na via de sinalização do TGF- $\beta$ , na qual a Smad3 ativa os genes precoce imediatos que codificam os reguladores da transcrição e os transdutores do sinal, enquanto a Smad2 regula os genes precoce imediatos e intermediários que respondem ao TGF- $\beta$  através da Smad3 (Yang e col., 2003).

O TGF- $\beta$  regula a atividade dos fibroblastos, promovendo a sua proliferação; induz a neoformação de tecido conjuntivo através da síntese e maturação dos componentes da matriz extracelular e bloqueia a

destruição da matriz extracelular recém-sintetizada (Beck e col., 1993; Sporn e Roberts, 1993; Yan e col., 2009). Assim, o TGF- $\beta$  tem um papel fundamental no desenvolvimento de fibrose em diferentes tecidos, induzindo a transcrição de fibrilas de Colagénio de um modo dependente da Smad3 e inibindo a degradação da matriz extracelular, que acumula (Yan e col., 2009).

De facto, o mediador Smad3 tem um papel importante na resposta fibrótica, tendo sido detetados altos níveis de Smad3 nuclear ativada nomeadamente na esclerodermia (Mori e col., 2003; Takagawa e col., 2003). A maior parte da atividade pró-fibrótica do TGF- $\beta$  é sinalizada através da Smad3 (Flanders, 2004), sendo a presença desta fundamental à indução da síntese de matriz extracelular. Já a indução de genes pró-fibróticos como o do Colagénio tipo I e o do Fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF, *connective tissue growth factor*) é regulada negativamente em fibroblastos Smad3 *null* (Holmes e col., 2001; Verrecchia e col., 2001). De referir, contudo, que apesar da Smad3 ter um papel importante na iniciação da resposta fibrótica, a manutenção da sua expressão poderá não se essencial à progressão da resposta patológica (Leask e Abraham, 2004). No processo fibrótico, a expressão da Smad2 não é aparentemente requerida (Ashcroft e col., 1999).

A ausência de um infiltrado inflamatório rico em células da linha monocítica-macrofágica é fundamental no presente estudo, uma vez que a diminuição do número de monócitos em modelos experimentais animais traduz-se numa redução da resposta fibrótica consistente com a consequente diminuição da secreção de TGF- $\beta$  por estas células (McCartney-Francis e Wahl, 1994). Neste processo, o facto de não haver expressão da Smad3 é crucial, uma vez que a Smad3 é crítica à quimiotaxia dos monócitos mediada pelo TGF- $\beta$  e a sua ausência traduz-se na diminuição do recrutamento de monócitos (Ashcroft e col., 1999). A ausência de expressão da Smad3 é também, neste âmbito, paradigmática, dado que a autoindução da expressão do TGF- $\beta$  nos fibroblastos é fortemente suprimida na ausência da Smad3 (Piek e col., 2001).

Sendo a proliferação celular dos fibroblastos ligamentares uma das respostas à aplicação de forças ortodônticas, a manutenção prolongada deste mecanismo de reposição celular poder-se-ia traduzir num processo de reparação do ligamento periodontal não por regeneração, mas por cicatrização com a formação de tecido fibrótico. No presente estudo, apesar de se ter detetado proliferação celular em ambos os lados do movimento como resposta à aplicação de força, é possível presumir que o processo não decorreu com uma excessiva produção de Colagénio ou de matriz extracelular que se pudesse traduzir em tecido fibroso patológico. Tal poderá ser devido ao facto da autoindução da síntese de TGF- $\beta$  e a síntese de matriz extracelular estarem comprometidas devido à ausência de expressão do mediador Smad3. De igual modo, além da Smad2 não ser essencial ao processo fibrótico, a sua intensa expressão indicia que ocorreu angiogénese e proliferação celular dos fibroblastos com menor magnitude. Deste modo, os resultados obtidos parecem confirmar que o processo de reparação do ligamento periodontal no lado de pressão, onde há expressão do TGF- $\beta$ , ocorre por regeneração e não por cicatrização. No lado de tensão, a questão não se levanta, uma vez que não foi observada expressão quer do TGF- $\beta$  quer da Smad3, indiciando também a intensa expressão da Smad2 que a proliferação de fibroblastos e a angiogénese foram de pouca magnitude.

A migração dos fibroblastos de áreas adjacentes para a zona afetada é outro mecanismo de reposição do reservatório celular que sofreu depleção, mas que está dependente da presença no meio ambiente de células que apresentem motilidade. Através da ativação por tensão mecânica ou citocinas, células mesenquimatosas diferenciam-se em miofibroblastos que guiam a reparação dos tecidos através da secreção de Colagénio e contraindo a matriz extracelular (Tomasek e col., 2002). Os miofibroblastos são células que se caracterizam pela expressão de  $\alpha$ -Sma e de fibronectina, encontrando-se num estágio intermediário de diferenciação parcial entre fibroblastos e células do músculo liso (Elberg e col., 2008).

Os miofibroblastos são metabólicamente e morfológicamente diferentes dos fibroblastos e a sua origem tem sido largamente questionada, dado que estas células apresentam um citoesqueleto muito heterogéneo: (1)

células epiteliais tubulares renais convertem-se em miofibroblastos através da EMT estimulada pelo TGF- $\beta$  (Fan e col., 1999; Elberg e col., 2006); (2) células musculares lisas perivasculares das paredes dos vasos sanguíneos diferenciam-se em miofibroblastos desmin-negativos produtores de Colagénio (Shum e McFarlane, 1988) e (3) os fibroblastos estromais diferenciam-se em miofibroblastos como resposta a fatores de crescimento ou citocinas inflamatórias secretadas durante uma lesão (Cogan e col., 2002).

A ativação dos miofibroblastos tem um papel importante no desenvolvimento da resposta fibrótica, dado que quando ativados, eles tendem a proliferar e a sintetizar grandes quantidades de proteínas da matriz extracelular (Cherng e col., 2008). Apesar de repararem defeitos e de reestabelecerem a integridade dos tecidos, eles não o regeneram, levando à produção excessiva de Colagénio e de cicatrizes fibrosas que diminuem a função tecidual (Hinz, 2009). Efetivamente, a força contrátil gerada pelos miofibroblastos é extremamente eficaz na remodelação fisiológica dos tecidos, mas ela é particularmente nefasta para a função tecidual, tal como o observado nas patologias fibróticas ou quando há a criação de cicatrizes hipertróficas (Cherng e col., 2008; Hinz, 2009). Nos processos de reparação, os miofibroblastos aceleram a cicatrização através da contração dos limites de uma ferida. Depois desta estar completa, estas células sofrem apoptose, especulando-se que nas patologias que decorrem com a formação de tecido fibrótico este mecanismo estará alterado e a persistência dos miofibroblastos resulta na contínua produção de matriz extracelular e contração do tecido (Darby e Hewitson, 2007).

De acordo com Cho e Garant (2000), num processo de regeneração do ligamento periodontal, novos fibroblastos diferenciam-se de células progenitoras perivasculares presentes no tecido intacto e a sua migração para a área afetada é facilitada pelas redes de fibronectina e fibrina presentes no ligamento. As novas fibras de Colagénio são sintetizadas rapidamente, geralmente de um modo desorganizado e sem ligação ao tecido ósseo adjacente, exigindo a futura reorganização e reorientação que o processo seja sustentado por um longo período de tempo. É a importante participação dos miofibroblastos na produção de matriz extracelular que os torna relevantes na regeneração do ligamento periodontal. Apesar do TGF- $\beta$  induzir a expressão de  $\alpha$ -Sma nos fibroblastos gengivais, nos fibroblastos da derme e nos miofibroblastos (Arora e McCulloch, 1994; Kissin e col., 2002; Ono e col., 2007), os próprios miofibroblastos secretam TGF- $\beta$  latente associado ao LAP que acumula na matriz extracelular (Hinz, 2010), ficando disponível para se ligar ao seu recetor na membrana citoplasmática sob a ação de forças de tensão, quer por estiramento da matriz extracelular quer pela indução da contração celular (Wipff e col., 2007).

A regulação transcricional da  $\alpha$ -Sma está dependente do contexto celular, bem como das diferenças entre as espécies animais usados nos trabalhos experimentais (Blank e col., 1992; Shimizu e col., 1995; Keogh e col., 1999; Cogan e col., 2002). No presente estudo realizado em ratos *Wistar* verificou-se a presença apenas de uma pequena população de células marcadas para a  $\alpha$ -Sma, que se presumem miofibroblastos, às 72 e 96 horas junto à superfície radicular. Tal facto permite afirmar que a indução da diferenciação dos miofibroblastos não será, neste modelo experimental, o mecanismo principal pelo qual o ligamento periodontal se regenera. Por outro lado, a fraca presença desta população celular vem também confirmar que o processo de reparação ocorreu por regeneração e não por cicatrização com a excessiva produção de Colagénio e de matriz extracelular que se pudesse levar à formação de tecido fibrótico patológico que comprometesse o movimento dentário ortodôntico, uma vez que se pensa que sejam os miofibroblastos as células primariamente responsáveis pela ativação do TGF- $\beta$  e pela conseqüente produção excessiva de matriz extracelular (Doyle e col., 2012).

O ligamento periodontal contribui também para a manutenção da homeostase e regeneração da estrutura e função dos tecidos periodontais através do seu conteúdo em células mesenquimatosas indiferenciadas, localizadas perivascularmente, as quais têm a capacidade de se diferenciarem, nomeadamente, em fibroblastos (Cho e Garant, 2000; Maeda e col., 2011). No entanto, em 2004, Seo e colaboradores isolaram no ligamento uma população de células estaminais multipotentes que têm as propriedades das células mesenquimatosas

indiferenciadas, mas que apresentam também propriedades únicas como uma enorme plasticidade, a capacidade de se autorrenovarem através da geração de colônias de células aderentes a plásticos utilizados na cultura de tecidos, assemelham-se *in vitro* a fibroblastos (Maeda e col., 2011) e podem diferenciar-se em osteoblastos, adipócitos e condrócitos (Gay e col., 2007). Estas células estaminais do ligamento periodontal existem em muito pequena quantidade, expressam os marcadores de superfície específicos das células estaminais STRO-1 e CD146 (Seo e col., 2004); expressam um marcador do ligamento periodontal, scleraxis (Maeda e col., 2011); possuem características péricito-like e como tal localizam-se como os péricitos no ligamento periodontal (Iwasaki e col., 2013). Para estudos *in vitro* foram isoladas duas linhas celulares clonais: (1) a linha celular I-11 que se diferencia em osteoblastos e adipócitos (Fujii e col., 2008) e (2) a linha celular I-17 que se diferencia em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e neurócitos (Tomokiyo e col., 2008).

Kono e colaboradores (2013) demonstraram *in vitro* que as células estaminais do ligamento periodontal expressam funcionalmente a via de transdução de sinal do TGF- $\beta$ . O TGF- $\beta$  secretado pelos tecidos periodontais contribui para a diferenciação de células imaturas presentes no ligamento em fibroblastos funcionais através da regulação positiva da expressão, nomeadamente, dos genes  $\alpha$ -SMA e COL-1 (Fujii e col., 2010). No entanto, nos estudos *in vitro* verificou-se também que o TGF- $\beta$  tem efeitos contraditórios: (1) nas células primárias, promove a proliferação e regula negativamente a expressão de  $\alpha$ -Sma, Colagénio tipo I e do RNAm da fibrilina I; (2) enquanto que nas linhas celulares de células estaminais do ligamento periodontal suprime a proliferação e regula positivamente a expressão do RNAm da fibrilina I. Estes dados vêm reconfirmar que o efeito do TGF- $\beta$  nas células do ligamento periodontal depende do estágio de diferenciação celular (Maeda e col., 2011).

Neste estudo não foi possível distinguir as células mesenquimatosas indiferenciadas das células estaminais do ligamento periodontal, tendo-se apenas observado a expressão do fator de crescimento em células com localização perivascular. Mesmo estas células marcadas com o anti-corpo para o TGF- $\beta$  foram impossíveis de discriminar morfológicamente em células mesenquimatosas indiferenciadas e péricitos. Mas dado que estas populações celulares têm uma localização sobreponível e um comportamento muito semelhante, nomeadamente no que diz respeito à sua capacidade para se diferenciarem em fibroblastos e estando todas elas num estágio primitivo indiferenciado, parte-se do princípio que *in vivo* traduzirão de modo muito similar a expressão do TGF- $\beta$ .

Por este motivo, era espetável que, neste estudo, houvesse precocemente a expressão do fator de crescimento pelas células mesenquimatosas indiferenciadas detetadas na região perivascular. Apesar da proliferação e diferenciação celular serem processos muito próximos, só foi observada marcação para o TGF- $\beta$  nestas células às 96 horas, presumindo-se que a diferenciação só foi ativada posteriormente à proliferação celular, numa altura em que o sistema periodontal agredido já estava numa fase de regeneração.

As resposta morfogénicas dos fibroblastos ao TGF- $\beta$ , além da migração e proliferação celular, incluem a EMT que é crucial durante a embriogénese, nas patologias fibróticas e na expansão de certos tumores (Proetzel e col., 1995; Chai e col., 2003; Gotzmann e col., 2004; Gordon e Blobel, 2008). Tal como mencionado na introdução, um modo de reparação tecidual na inflamação é o mecanismo da MET/EMT (Iwano e col., 2002), através do qual há a produção de células mesenquimatosas necessárias à regeneração tecidual (Kalluri e Weinberg, 2009). No mecanismo biológico da EMT, as células epiteliais polarizadas sofrem uma série de alterações bioquímicas que lhe permitem assumir o fenótipo de células mesenquimatosas (Kalluri & Neilson, 2003), que na cicatrização e regeneração de tecidos são normalmente fibroblastos e outras células associadas à reconstrução e reestruturação de tecidos lesados (Kalluri & Weinberg, 2009). Neste mecanismo, o TGF- $\beta$  participa, regulando a EMT quer em tecidos embrionários quer em tecidos adultos (Iwano e col., 2002).

No desenvolvimento dentário, sabe-se que as células da bainha radicular epitelial de Hertwig participam na formação de cemento acelular através da EMT e que o TGF- $\beta$  é um dos responsáveis pela estimulação da transição, controlando nomeadamente a diferenciação das células da bainha epitelial em células cementoblasto-

-like (Chen e col., 2014). Já nos indivíduos adultos, os restos epiteliais de Malassez, remanescentes da bainha radicular epitelial de Hertwig, que aqui permanecem após o desenvolvimento dentário participam na regeneração do cemento e esmalte dentários (Hasegawa e col., 2003; Foster e col., 2007; Shinmura e col., 2008). As células da bainha radicular epitelial de Hertwig e as células remanescentes presentes nos restos epiteliais de Malassez constituem uma população de células epiteliais muito particular que apresentam características de células estaminais (Nam e col., 2011; Xiong e col., 2012), sendo capazes passar pela EMT (Xiong e col., 2012).

Deste modo, é possível especular que um dos meios pelo qual o ligamento periodontal, agredido pela aplicação de forças ortodônticas e no qual há expressão do TGF- $\beta$ , reponha a densidade celular necessária à manutenção da homeostase do tecido seja através da EMT. No presente estudo, em algumas amostras de todos os grupos teste foram observadas no ligamento periodontal imagens sugestivas de restos epiteliais de Malassez. No entanto, devido ao seu reduzido número não foram efetuados estudos subsequentes no sentido de comprovar se a EMT está ativada num processo inflamatório associado ao movimento dentário ortodôntico, pelo que esta possibilidade permanece, por enquanto, como perspectiva futura que exige uma investigação mais detalhada.

Por último, também é possível supor que as células endoteliais em proliferação que expressam TGF- $\beta$  podem ser induzidas a comprometerem-se num processo de diferenciação em células fibroblasto-like. Tal ocorre através do mecanismo da EndMT que está nomeadamente ativado nos processos de fibrose cardíaca e em processos carcinogénicos (Zeisberg e col., 2007; Goumans e col., 2008). Contudo, no presente trabalho, dado o número reduzido de secções passíveis de serem obtidas das amostras estudadas, não foi possível comprovar esta hipótese, exigindo também esta possibilidade um estudo mais aprofundado.



#### 4. Conclusões

1. O animal de experimentação escolhido, o rato *Wistar*, apesar das diferenças morfológicas e fisiológicas relativamente ao homem, demonstrou ser adequado a este modelo de investigação experimental, permitindo uma boa análise descritiva dos resultados.

2. A opção pelo método de Waldo e Rothblatt para induzir a força ortodôntica mostrou ser adequado ao trabalho experimental, permitindo a reprodutibilidade em todos os animais dos grupos teste.

3. O processamento das amostras para análise histológica e análise por IHC, apesar das condicionantes constituídas pela descalcificação dos tecidos duros e pela recuperação dos epitopos dos antígenos que levam à produção de artefactos técnicos, permitiu uma boa observação por microscopia de luz das secções obtidas.

4. Dado o facto de não se ter detetado infiltrado inflamatório de neutrófilos às 24 horas, presume-se que a inflamação aguda ter-se-á dado antes. Nesta altura já estaria estabelecida uma inflamação crónica que caminhava no sentido da resolução, conduzindo à reparação por regeneração dos tecidos peridontais. Às 96 horas foi possível observar, de um modo geral, uma normalização dos tecidos periodontais analisados quer no lado de pressão quer no lado de tensão do movimento ortodôntico.

5. A remodelação do tecido ósseo foi, de um modo geral, concordante com o exposto na teoria do fluxo sanguíneo, surgindo áreas de reabsorção óssea direta da superfície alveolar no lado do ligamento peridontal sujeito a compressão e áreas de aposição óssea no lado do ligamento peridontal sujeito a estiramento. Contudo, a observação de áreas de aposição óssea no lado de pressão e áreas de reabsorção óssea no lado de tensão do movimento indicia que a resposta do tecido ósseo à distribuição das forças ortodônticas é mais complexa, quer no que diz respeito à resposta à intensidade da força, mas também à distribuição das forças de tensão e pressão ao longo da superfície da parede alveolar.

6. A ossificação intramembranosa observada às 72 e 96 horas revelou ser um mecanismo fundamental no processo de regeneração do tecido ósseo alveolar no lado do periodonto sujeito a forças compressivas.

7. A neoangiogénese observada, principalmente no lado do ligamento peridontal sujeito a pressão, foi concordante com a presença, não só, de um processo inflamatório que caminhava para a sua resolução, mas também com uma extensa remodelação que estava a ocorrer ao nível do tecido ósseo alveolar.

8. O facto de não se ter observado infiltrado inflamatório em nenhuma das secções analisadas indicia que, neste modelo experimental, os fibroblastos serão células efetoras importantes na regulação do processo

inflamatório. Este pressuposto deriva da capacidade dos fibroblastos estabelecerem as condições microambientais necessárias à resolução do processo inflamatório e à remodelação e regeneração do ligamento periodontal.

9. Foi detetada a expressão do TGF- $\beta$  apenas nos tecidos periodontais sujeitos a forças de pressão, sugerindo que, neste modelo experimental, somente neste lado do movimento ortodôntico a remodelação dos tecidos conjuntivos laxo e calcificado é sinalizada através do TGF- $\beta$ . A remodelação que ocorre no lado de tensão não será mediada através de qualquer via de sinalização do TGF- $\beta$ .

10. A ausência de sobreposição na expressão do TGF- $\beta$  e dos seus mediadores R-Smad, Smad2 e Smad3, indicia que a sinalização do TGF- $\beta$ , neste modelo experimental, não se efetuará através da sua via de sinalização canónica, mas através de uma via de sinalização não canónica.

11. O facto de não haver sobreposição na expressão da Smad2 e Smad3 indicia que, neste modelo experimental, ambas as R-Smads atuam de modo independente.

12. A ausência de sobreposição na expressão do TGF- $\beta$  e da IL-10 permite supor que, apesar de ambas as citocinas terem uma potente ação anti-inflamatória, neste modelo experimental, elas atuam de modo independente e não relacionado.

13. A ausência de expressão da Smad3 e a intensa expressão da Smad2 pressupõe que o mecanismo de reparação do ligamento periodontal decorre sem a produção excessiva de Colagénio e de matriz extracelular. Por este motivo, não se observou a existência de tecido fibrótico patológico que eventualmente interferisse com o movimento dentário ortodôntico. Tal facto vem confirmar que o processo de reparação dar-se-á por regeneração e não por cicatrização.

14. A expressão do PCNA a partir da 24 horas vem confirmar a proliferação mesenquimatosa observada na análise histológica. A maior intensidade observada às 72 e 96 horas no lado do movimento sob a ação de uma força de pressão. Tais factos sugerem que o ligamento periodontal sujeito a uma agressão mais acentuada responde mais intensamente e durante mais tempo através da proliferação das suas células constituintes.

15. A observação apenas às 96 horas de células mesenquimatosas indiferenciadas a expressarem TGF- $\beta$  indicia que a diferenciação celular não será o mecanismo principal pelo qual é repostado o reservatório de células ligamentares. Efetivamente, este mecanismo foi ativado posteriormente à proliferação celular.

16. A observação às 72 e 96 horas de apenas uma pequena população de células, adjacentes à superfície radicular, a expressarem a proteína  $\alpha$ -Sma, indicia que não será o processo de diferenciação em miofibroblastos a via primordial na reposição da população de células do ligamento periodontal.

17. A pequena população de miofibroblastos observada vem confirmar que o processo de reparação do ligamento periodontal não decorrerá com a produção de tecido fibrótico patológico, uma vez que estas células são fundamentais na produção de grandes quantidades de proteínas da matriz extracelular.

## 5. Perspetivas futuras

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o mecanismo de reparação do periodonto agredido se manteve ativado, levando ao restabelecimento das características biológicas e da integridade morfológica dos tecidos periodontais no momento em que a força aplicada deixou de estar efetiva, através de um processo de regeneração e não através de um processo de cicatrização.

O facto do TGF- $\beta$  não sinalizar através da via de sinalização canónica parece ser indicativo que os efeitos nocivos resultantes da aplicação permanente de uma força que mantém, durante um longo período de tempo, um processo inflamatório ativado, não serão tão extensos e não conduzem obrigatoriamente a uma reparação que decorre com a formação de tecido fibroso. Neste contexto torna-se particularmente importante a ausência de expressão da Smad3, dado que o TGF- $\beta$  regula a atividade dos fibroblastos induzindo a formação de tecido conjuntivo e Colagénio e bloqueando a destruição da matriz extracelular recém-sintetizada num processo mediado pela Smad3, um efetor essencial nos eventos patológicos mediados pelo TGF- $\beta$ . Os resultados obtidos confirmam esta hipótese, uma vez que independentemente da hiperplasia devida à proliferação de fibroblastos no ligamento periodontal, a reparação decorre naturalmente por regeneração.

Deste modo, ultrapassando as limitações inerentes ao facto deste modelo experimental ter sido realizado em rato, restringindo a transposição dos resultados para humano, como estratégia futura é necessário averiguar mais extensivamente as vias de sinalização não canónicas do TGF- $\beta$  no processo inflamatório induzido pela aplicação de forças ortodônticas.

Por outro lado, há que ter em consideração que este desenho experimental só permitiu a avaliação dos efeitos da aplicação de força num período muito curto de tempo. Este facto aliado à grande capacidade de reparação que o animal experimental utilizado tem, exige estudos futuros com períodos experimentais mais prolongados e com desenhos experimentais que permitam a reativação das forças aplicadas, mimetizando os tratamentos ortodônticos em humano. Sendo muito reduzida a viabilidade de investigar os mecanismos biológicos da inflamação em modelos humanos, uma das eventuais possibilidades é a determinação da expressão dos mediadores das vias de sinalizações do TGF- $\beta$  no fluido crevicular de sujeitos humanos.

A EMT e a EndMT são mecanismos fundamentais nos processos de reparação tecidual, quer eles se dêem por regeneração quer por cicatrização, iniciando-se ambas como parte de programas que normalmente geram fibroblastos. Deste modo, uma futura linha de investigação passará pela determinação da importância

de ambos os mecanismos na resposta biológica do periodonto às forças do movimento dentário ortodôntico. Neste âmbito será, nomeadamente, importante investigar o papel dos restos epiteliais de Malassez no processo de reposição celular periodontal por EMT.

Neste âmbito, importa averiguar se o TGF- $\beta$  e os seus mediadores podem ser utilizados como biomarcadores terapêuticos da reposição das populações celulares essenciais à regeneração dos tecidos periodontais durante os processos inflamatórios associados ao movimento dentário ortodôntico.

## **Capítulo III. Resumen**

---



As estratégias clínicas utilizadas no tratamento ortodôntico deverão estar fundamentadas nas interações que ocorrem entre os sistemas de forças aplicados e os mecanismos biológicos que intervêm na resposta dos tecidos periodontais afetados. Tal facto implica que as abordagens terapêuticas e a escolha da mecanoterapia a utilizar no tratamento ortodôntico tenham em linha de conta não só o perfil bioquímico de cada paciente, mas também o respetivo fenótipo.

O movimento dentário gerado pela aplicação de forças ortodônticas é resultante de um processo inflamatório controlado, criado artificialmente pelo ortodontista, com o objetivo de obter resultados terapêuticos. Deste modo, a remodelação tecidual que acontece durante o movimento é facilitada, em grande parte, por reações inflamatórias que ocorrem nos tecidos periodontais sujeitos a forças de pressão no lado do movimento e a forças de tensão no lado oposto ao do movimento. Estas forças ortodônticas vão estimular o sistema nervoso e o sistema imunitário e a inflamação produzida é a resposta temporária de um sistema fechado que as entende como uma agressão.

As forças exercidas sobre os dentes são transmitidas ao ligamento periodontal, cujas células respondem regulando a reabsorção e aposição de tecido ósseo através de sinalização autócrina e parácrina às células alvo.

As respostas tecidulares e celulares iniciam-se na fase inicial do movimento ortodôntico, na qual a literatura refere que a inflamação é aguda e predominantemente exsudativa, havendo vasodilatação dos vasos periodontais e migração dos leucócitos para o ligamento periodontal. Aqui, estes são localmente responsáveis pela síntese de variadas citocinas sinalizadoras que estimulam a síntese e segregação de mediadores como PGs, fatores de crescimento, assim como de mais citocinas.

Um a dois dias após a aplicação da força, a inflamação aguda converte-se numa inflamação crónica predominantemente proliferativa no que diz respeito aos fibroblastos, células endoteliais, osteoblastos e às células dos espaços medulares que se mantém até à reativação do aparelho fixo durante a consulta de controlo seguinte com o ortodontista, da qual resultará uma nova fase de inflamação aguda que se irá sobrepor há já existente inflamação crónica.

Neste cenário, tornou-se importante a determinação do papel que diferentes moléculas, como os fatores de crescimento, têm nos processos bioquímicos do movimento dentário. Na realidade, estudos efetuados até à data têm visado sobre diferentes aspetos dos mecanismos moleculares da resposta inflamatória do ligamento periodontal. A participação deste tecido nos processos inflamatórios é mediada através da síntese e segregação de moléculas que alteram a proliferação, diferenciação e as funções secretoras das suas células constituintes.

Os processos inflamatórios subjacentes a um vasto número de doenças têm sido objeto de estudo, dada a crescente descoberta de patologias associadas a marcadores moleculares da inflamação. Muitos aspectos das cascatas inflamatórias que decorrem nestas situações ainda estão sob análise, sendo crucial a identificação dos participantes teciduais, celulares, moleculares e genéticos, particularmente tendo em vista a implementação de novas estratégias terapêuticas.

Uma vez que atualmente os estudos sobre as vias de sinalização do TGF- $\beta$  no movimento dentário ortodôntico são relativamente escassos, desconhecendo-se se nas alterações que o periodonto sofre sob a ação de forças, esta citocina multifuncional se expressa nomeadamente através da via de sinalização canónica das Smads. Por este motivo, um dos objetivos deste trabalho consistiu em identificar não só a expressão do TGF- $\beta$  no ligamento periodontal sujeito à ação de forças, mas também a expressão das R-Smads, tendo em vista determinar a importância da via canónica do TGF- $\beta$  nos processos de remodelação, adaptação e reparação do periodonto durante o movimento ortodôntico. Pretendeu-se também avaliar se a persistência da ativação/inativação da via de sinalização do TGF- $\beta$  poderá ser usada como alvo terapêutico em processos que decorrem com alterações dos tecidos periodontais.

O protocolo experimental envolveu a utilização de 70 ratos albinos *Wistar* machos. Os animais foram divididos em 5 grupos, com o grupo de controlo constituído por 10 animais, enquanto os restantes grupos experimentais contiveram 15 animais cada. Com exceção do grupo controlo, os grupos teste foram sujeitos à aplicação de uma força ortodôntica, induzida através do método de Waldo e Rothblatt, durante 24, 48, 72 e 96 horas.

O estudo morfológico demonstrou que as principais alterações histológicas do ligamento periodontal, proliferação mesenquimatosa e angiogénese, fenómenos compatíveis com um processo de remodelação e adaptação do ligamento, foram observadas logo às 24 horas, aspectos que se mantiveram até às 72 horas. Às 96 horas, o ligamento periodontal encontrou-se praticamente regenerado, sendo, contudo, observado no lado de pressão do movimento, alguma desorganização das fibras periodontais. Relativamente ao osso alveolar, desde as 24 horas que se observou a característica reabsorção direta da parede alveolar no lado de pressão e aposição óssea no lado de tensão do movimento. De ressaltar que estes fenómenos não foram sempre consistentes com o que se conhece da teoria de fluxo sanguíneo, sendo detetadas também áreas de aposição no lado de pressão e áreas de reabsorção no lado de tensão. A partir das 72 horas foram observadas zonas de ossificação intramembranosa adjacentes à parede alveolar no lado de pressão. Às 96 horas, apesar de ainda continuar a ser observada ossificação intramembranosa, a remodelação alveolar já se poderia considerar, de um modo geral, incipiente.

A análise por IHC demonstrou que o TGF- $\beta$  apenas se encontrou expresso no lado de pressão do movimento. No grupo de controlo apenas foram detetados cementoblastos marcados, sendo somente observados fibroblastos a expressarem o fator de crescimento a partir das 24 horas. Às 72 horas tornou-se patente a expressão do TGF- $\beta$  por osteoblastos e osteoblastos-*like* adjacentes à superfície alveolar, situação que persistiu às 96 horas. Neste último grupo teste foram também visíveis células mesenquimatosas indiferenciadas a expressarem o TGF- $\beta$ .

A Smad2 esteve consistentemente expressa intensamente em todos os tecidos periodontais analisados, quer do lado de pressão quer do lado de tensão, ao longo de todos os períodos experimentais. Nos grupos iniciais, os cementoblastos apresentaram uma expressão mais intensa, mas às 72 e 96 horas, em ambos os lados do movimento, os osteoblastos foram a população celular que surgiram com uma expressão mais acentuada.

A Smad3 não apresentou expressão em qualquer das populações celulares analisadas em nenhum dos grupos experimentais.

A IL-10 esteve consistentemente expressa, com intensidade moderada, em todos os grupos experimentais, em ambos os lados do movimento dentário. Nestes grupos, os fibroblastos, cementoblastos

e células mesenquimatosas indiferenciadas marcaram positivamente a citocina, tendo os fibroblastos, de um modo geral, apresentado uma marcação menos intensa que as outras populações celulares. Às 72 e 96 horas, osteoblastos e osteoblastos-*like* surgiram a expressar a IL-10, particularmente junto à superfície alveolar, área onde estava a ocorrer uma extensa remodelação do tecido ósseo, inclusivamente com processos de ossificação intramembranosa.

A  $\alpha$ -Sma esteve consistentemente expressa em células da musculatura lisa de vasos sanguíneos presentes nas secções de todos os grupos experimentais. Às 72 e 96 horas surgiram algumas células, presumivelmente com fenótipo de miofibroblastos, a expressarem a proteína, particularmente junto à superfície radicular em qualquer um dos lados do movimento.

O PCNA não apresentou expressão nas secções do grupo de controlo. A partir das 24 horas começou a ser observada uma pequena população de fibroblastos e cementoblastos-*like* a expressarem PCNA, em ambos os lados do movimento, cuja intensidade de expressão aumentou às 48 horas. As 72 horas foram o período experimental no qual a expressão do PCNA nos fibroblastos e cementoblastos-*like* foi mais intensa, sendo, no entanto, de salientar que as populações celulares marcadas apresentaram uma maior densidade no lado de pressão. Às 96 horas, foi flagrante a diminuição da densidade de células marcadas para o PCNA, surgindo com uma expressão muito semelhante à das 24 horas. De referir que neste último grupo experimental também no lado de tensão somente uma pequena população surgiu a expressar a proteína.

De um modo geral, pode-se concluir deste estudo que:

- a) O TGF- $\beta$ 1 encontrou-se expresso desde do primeiro dia, demonstrando que a sua via de sinalização se encontra ativada. Contudo, ao não haver sobreposição entre as áreas que apresentavam imunomarcação para o TGF- $\beta$ , Smad2 e Smad3 é possível concluir que o TGF- $\beta$  não sinaliza através da sua via de sinalização canónica e que ambas as R-Smads atuam independentemente uma da outra.
- b) Devido ao facto de não haver sobreposição entre as áreas marcadas para o TGF- $\beta$  e IL-10, concluiu-se que apesarem de serem citocinas anti-inflamatórias que em algumas situações cooperam, neste modelo experimental não há correlação na sua ação, atuando ambas independentemente.
- c) Devido à ausência de expressão da Smad3 e à presença de apenas uma pequena população de miofibroblastos, o processo de reparação do ligamento do ligamento periodontal dá-se sem a excessiva produção de Colagénio e de matriz extracelular que possa conduzir a um processo de fibrose patológica.



## **Capítulo IV. Abstract**

---



Orthodontic clinic strategies must be implemented based on the interactions occurring between the applied systems of forces and the biologic mechanisms underlying the responses of the affected periodontal tissues. Thus, as to the orthodontic treatment both the therapeutic strategies and the mechanotherapy to be applied have to take in consideration both the patients' biochemical profiles and their phenotypes.

The therapeutic strategies used on orthodontic treatments generate a controlled inflammatory process crucial to the ensuing dental movement. Therefore, following the application of pressure forces on the movement side and to tension forces on the opposite side, the resulting inflammatory responses that take place within the periodontal tissue are fundamental to the tissue remodeling processes occurring during the dental movement. The orthodontic forces stimulatory action over the nervous and the inflammatory systems, and the resultant inflammatory responses are the ultimate reaction of a closed system to aggression.

Following the application of orthodontic forces the autocrine and paracrine signaling within the periodontal ligament cellular populations to regulate the reabsorption and apposition of bone tissue in the target cells.

The cellular and tissue responses begin during the initial phase of orthodontic movement encompassing, accordingly to the literature, predominantly exudative acute inflammation, incorporating periodontal vessels vasodilation and leukocytes migration to the periodontal ligament. The migrating leukocytes are locally accountable for the synthesis of the cytokines that will induce the synthesis and secretion of mediators such as prostaglandins (PGs), growth factors, as well as other cytokines. One or two days following the application of orthodontic forces, the acute inflammation becomes chronic encompassing the proliferation of fibroblasts, endothelial cells, osteoblasts and cells of medullar space, and lasting till the next visit to the orthodontist. Thereafter another acute inflammation phase will take place superimposing the existing chronic inflammation.

In this scenario was thus mandatory to evaluate the role that different cytokines and growth factors play in the biochemical processes underlying tooth movement. Several studies reported different features of the crucial molecular mechanisms involved in the inflammatory response of the periodontal ligament. The periodontal ligament participation in the process is mediated by the synthesis and secretion of molecules that change the differentiation status as well as the proliferation and the secretion capacity of the cellular populations of the periodontal ligament.

Presently, the inflammatory processes underlying several pathologies have been the focus of intensive research as result of the growing knowledge on the role that the molecular biomarkers associated to inflammation play in those pathologies. Several features of the inflammatory cascades involved in different

pathologies are under screen being crucial the identification of tissues and cellular populations, as well as the molecular and genetic events involved aiming at new therapeutic strategies.

The knowledge on the role of TGF- $\beta$  signaling pathway on orthodontic tooth movement is scarce. As a matter of fact, is still unknown whether this multifunctional cytokine canonical pathway involving Smads is involved in the changes observed in the periodont following the application of forces. Therefore, the propose of the present work was to evaluate the expression of TGF- $\beta$  in the periodontal ligament under the stress of orthodontic forces, as well as the expression of the R-Smads, aiming to assess the role of the canonical TGF- $\beta$  pathway on the remodeling, adaptation and repair processes occurring along the orthodontic movement. It was also the purpose of the present work to assess whether the persistent activation/inactivation of the canonical TGF- $\beta$  pathway could be used as therapeutic target in processes occurring with changes in the periodontal tissues.

The experimental protocol used 70 male albino Wistar rats. Animals were divided in groups, with the control group containing 10 rats while all the other groups enclosing 15 animals each. Except the control group, all the other animals were submitted to an orthodontic force according to the modified method of Waldo and Rothblatt for 24, 48, 72 and 96 hours.

The morphologic evaluation revealed that major histological changes, such as mesenchymal cell proliferation (hipercellularity) and angiogenesis, were observed in the periodontal ligament within the first 24 hours following the application of orthodontic forces. At 72 hours both histologic aspects could still be observed. However at 96 hours, although most of the periodontal ligament repair and remodeling process was over, some disorganization of periodontal fibres was present at compression sites.

As to the alveolar bone, as soon as 24 hours, direct resorption of the alveolar surface at compression sites and bone apposition at tension sites were observed.

As to the alveolar bone, reabsorption at compression sites and apposition at tension sites were observed at 24, 48 and 72 hours following the application of the orthodontic force. Conversely, at 96 hours these processes were practically absent. However these phenomena were not always consistent with what is known about the blood flow theory and, in some sections, bone resorption was observed at tension sites and bone apposition was observed at compression sites. After 72 hours intramembranous ossification could be seen in the compression side of the orthodontic movement near the alveolar wall. At 96 hours, although intramembranous ossification could still be observed, alveolar remodeling could be considered residual.

IHC analysis showed that TGF- $\beta$  was only expressed in cementoblasts at the compression side of the movement. After 24 hours, fibroblasts were also observed expressing the growth factor and after 72 hours osteoblasts and osteoblast-like cells expressing TGF- $\beta$  were detected near the alveolar wall. At 96 hours, undifferentiated mesenchymal cells were also detected expressing TGF- $\beta$  both at the tension and compression sides of the movement.

Smad2 was consistently and intensely expressed in all periodontal tissues analyzed both at the tension and compression sides, along all experimental periods. More intense expression of Smad2 was detected in the cementoblasts of the early test groups. At 72 and 96 hours, at both sides of the movement, osteoblasts also intensely express Smad2.

IHC analysis revealed that in none of the experimental groups' cellular populations Smad3 was expressed.

IL-10 was consistently expressed with moderate intensity in all the experimental groups, on both sides of tooth movement. In these experimental groups, fibroblasts, cementoblasts and undifferentiated mesenchymal cells expressed the cytokine, although the fibroblasts, in general, displayed a less intense expression when compared with the other cell populations. At 72 and 96 hours, osteoblasts and osteoblast-like cells expressed IL-10, particularly along the alveolar surface area where an extensive remodeling of bone tissue was occurring, including with intramembranous ossification processes.

$\alpha$ -SMA was consistently expressed in smooth muscle cells of some blood vessels present in sections of all experimental groups. At 72 and 96 hours there were a few cells, presumably with myofibroblast phenotype, positively expressing the protein, particularly along the root surface on both sides of the orthodontic movement.

PCNA was not expressed in any section of the control group. In Group B a small population of fibroblasts and cementoblast-like cells were observed expressing PCNA on both sides of the movement. The PCNA expression increased in these cell populations at 48 hours, reaching its maximum at 72 hours. However, after 72 hours both cell populations showed a decrease of density and intensity of the protein expression on the pressure side. At 96 hours was observed a decrease of the protein expression on both sides of the movement.

Overall, the major conclusions of the present study were:

- a) TGF- $\beta$ 1 was expressed in all experimental groups in the compression side, showing that its signaling pathway is activated. However, since it was not observed the simultaneous expression of TGF- $\beta$ , Smad2 and Smad3 is possible to conclude that TGF- $\beta$  does not signal through the canonical signaling pathway and both R-Smads act independently of each another.
- b) Since there was no overlap between the expression of TGF- $\beta$  and IL-10, it seems that although both proteins are anti-inflammatory cytokines that in some situations cooperate, in this experimental model no correlation was observed and both cytokines act independently.
- c) Due to lack of expression of Smad3 and the presence of only a small population of myofibroblasts, the repair process of the periodontal ligament occurs without the excessive production of collagen and extracellular matrix that might lead to a pathological fibrosis process.



## **Capítulo V. Bibliografía**

---



- Abass SK, Hartsfield JK Jr. Investigation of genetic factors affecting complex traits using external apical root resorption as a model. *Semin Orthod.* 2008;14:115-24.
- Abreu A. Estudo da proliferação celular no movimento dentário experimental. Tese de mestrado em Ortodontia. Coimbra: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 2004.
- Aggarwal BB. Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB. *Ann Rheum Dis.* 2000;59 Suppl 1:i6-16.
- Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.* 2001;487:318-22.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. New York: Garland Science; 2002 [Internet]. ISBN-10: 0-8153-3218-1 ISBN-10: 0-8153-4072-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26889/#A4182>.
- Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M. Orthodontic movement induces high numbers of cells expressing IFN-gamma at mRNA and protein levels. *J Interferon Cytokine Res.* 2000;20:7-12.
- Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;119:307-12.
- Alliston T, Choy L, Ducy P, Karsenty G, Derynck R. TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J.* 2001;20:2254-72.
- Alvarez J, Horton J, Sohn P, Serra R. The perichondrium plays an important role in mediating the effects of TGF-beta1 on endochondral bone formation. *Dev Dyn.* 2001;221:311-21.
- Anastasi G, Cordasco G, Matarese G, Rizzo G, Nucera R, Mazza M, Militi A, Portelli M, Cutroneo G, Favaloro A. An immunohistochemical, histological, and electron-microscopic study of the human periodontal ligament during orthodontic treatment. *Int J Mol Med.* 2008;21:545-54.
- Ando T, Kawabe T, Ohara H, Ducommun B, Itoh M, Okamoto T. Involvement of the interaction between p21 and proliferating cell nuclear antigen for the maintenance of G2/M arrest after DNA damage. *J Biol Chem.* 2001;276:42971-7.
- Andrade I Jr, Taddei SRA, Souza PEA. Inflammation and Tooth Movement: The Role of Cytokines, Chemokines, and Growth Factors. *Semin Orthod.* 2012;18:4257-69.
- Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, Ayala F, Sato Y, F SS, N CF, Soares FA. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. *J Bras Patol Med Lab.* 2007;43:55-60.
- André P, Hartwell D, Hrachovinová I, Saffaripour S, Wagner DD. Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:13835-40.
- Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir Dig.* 2012;25:49-51.

- Andrews PV, Helme RD, Thomas KL. NK-1 receptor mediation of neurogenic plasma extravasation in rat skin. *Br J Pharmacol.* 1989;97:1232-8.
- Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci.* 2003;116:217-24.
- Aoki CA, Borchers AT, Li M, Flavell RA, Bowlus CL, Ansari AA, Gershwin ME. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2005;4:450-9.
- Apajalhti S, Sorsa T, Railavo S, Ingman T. The in vivo levels of matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during initial orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2003;82:1018-22.
- Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev.* 1998;50:197-263.
- Arora PD, McCulloch CA. Dependence of collagen remodelling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1994;159:161-75.
- Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JL, Mizel DE, Anzano M, Greenwell-Wild T, Wahl SM, Deng C, Roberts AB. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol.* 1999;1:260-6.
- Ashizawa Y, Sahara N. Quantitative evaluation of newly formed bone in the alveolar wall surrounding the root during the initial stage of experimental tooth movement in the rat. *Arch Oral Biol.* 1998;43:473-84.
- Atala A, Irvine DJ, Moses M, Shaunak S. Wound Healing Versus Regeneration: Role of the Tissue Environment in Regenerative Medicine. *MRS Bull.* 2010;35.
- Atanga E, Dolder S, Dauwalder T, Wetterwald A, Hofstetter W. TNF $\alpha$  inhibits the development of osteoclasts through osteoblast-derived GM-CSF. *Bone.* 2011;49:1090-100.
- Atarashi K, Hirata T, Matsumoto M, Kanemitsu N, Miyasaka M. Rolling of Th1 cells via P-selectin glycoprotein ligand-1 stimulates LFA-1-mediated cell binding to ICAM-1. *J Immunol.* 2005;174:1424-32.
- Attisano L, Wrana JL. Mads and Smads in TGF beta signalling. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10:188-94.
- Azuma M. Study on histologic changes of periodontal membrane incident to experimental tooth movement. *Bull Tokyo Med Dent Univ.* 1970;17:149-178.
- Baba S, Kuroda N, Arai C, Nakamura Y, Sato T. Immunocompetent cells and cytokine expression in the rat periodontal ligament at the initial stage of orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol.* 2011;56:466-73.
- Baggiolini M. Activation and recruitment of neutrophil leukocytes. *Clin Exp Immunol.* 1995;101 Suppl 1:5-6.
- Bandow K, Nishikawa Y, Ohnishi T, Kakimoto K, Soejima K, Iwabuchi S, Kuroe K, Matsuguchi T. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) induces RANKL, MCP-1, and MIP-1beta expression in osteoblasts through the angiotensin II type I receptor. *J Cell Physiol.* 2007;211:392-8.
- Bartold PM, Narayanan AP. Inflammation and wound healing. In: Bartold PM, Narayanan AP editors. *Biology of periodontal connective tissues.* Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc. 1998. p. 47-69.
- Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol* 2000. 1997;13:20-40.
- Beck LS, DeGuzman L, Lee WP, Xu Y, Siegel MW, Amento EP. One systemic administration of transforming growth factor-beta 1 reverses age- or glucocorticoid-impaired wound healing. *J Clin Invest.* 1993;92:2841-9.
- Bellingan GJ, Xu P, Cooksley H, Cauldwell H, Shock A, Bottoms S, Haslett C, Mutsaers SE, Laurent GJ. Adhesion molecule-dependent mechanisms regulate the rate of macrophage clearance during the resolution of peritoneal inflammation. *J Exp Med.* 2002;196:1515-21.
- Bendre MS, Montague DC, Peery T, Akel NS, Gaddy D, Suva LJ. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone.* 2003;33:28-37.
- Bergmann P, Schoutens A. Prostaglandins and bone. *Bone.* 1995;16:485-8.
- Bergomi M, Cugnoni J, Botsis J, Belser UC, Anselm Wiskott HW. The role of the fluid phase in the viscous response of bovine periodontal ligament. *J Biomech.* 2010;43:1146-52.

- Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P. Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest*. 2005;128:585S-590S.
- Biancheri P, Giuffrida P, Docena GH, MacDonald TT, Corazza GR, Di Sabatino A. The role of transforming growth factor (TGF)- $\beta$  in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25:45-55.
- Bicknell S, van Eeden S, Hayashi S, Hards J, English D, Hogg JC. A non-radioisotopic method for tracing neutrophils in vivo using 5'-bromo-2'-deoxyuridine. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994;10:16-23.
- Bildt MM, Bloemen M, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod*. 2009;31:529-35.
- Blank RS, McQuinn TC, Yin KC, Thompson MM, Takeyasu K, Schwartz RJ, Owens GK. Elements of the smooth muscle alpha-actin promoter required in cis for transcriptional activation in smooth muscle. Evidence for cell type-specific regulation. *J Biol Chem*. 1992;267:984-9.
- Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003;170:191-203.
- Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, Arteaga CL, Moses HL. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*. 2001;12:27-36.
- Bodine PV, Riggs BL, Spelsberg TC. Regulation of c-fos expression and TGF-beta production by gonadal and adrenal androgens in normal human osteoblastic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995;52:149-58.
- Bodine PV, Billiard J, Moran RA, Ponce-de-Leon H, McLarney S, Mangine A, Scrimo MJ, Bhat RA, Stauffer B, Green J, Stein GS, Lian JB, Komm BS. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 controls osteoblast and osteocyte apoptosis. *J Cell Biochem*. 2005;96:1212-30.
- Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y, Nathan C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J Biol Chem*. 1992;267:23301-8.
- Bolon B. Gender agenda: sex bias can be justified in animal research. *Nature*. 2010;466:28.
- Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann NY Acad Sci*. 2007;1116:281-90.
- Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473:139-46.
- Brady TA, Piesco NP, Buckley MJ, Langkamp HH, Bowen LL, Agarwal S. Autoregulation of periodontal ligament cell phenotype and functions by transforming growth factor- $\beta$ 1. *J Dent Res*. 1998;77:1779-90.
- Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*. 1987;326:515-7.
- Breen EC, Fu Z, Normand H. Calcyclin gene expression is increased by mechanical strain in fibroblasts and lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;21:746-52.
- Breen EC, Ignatz RA, McCabe L, Stein JL, Stein GS, Lian JB. TGF beta alters growth and differentiation related gene expression in proliferating osteoblasts in vitro, preventing development of the mature bone phenotype. *J Cell Physiol*. 1994;160:323-35.
- Bridges T, King G, Mohammed A. The effect of age on tooth movement and mineral density of the alveolar tissues of the rat. *Am J orthod dentofac Orthop*. 1988;93:245-50.
- Brown CB, Boyer AS, Runyan RB, Barnett JV. Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science*. 1999;283:2080-2.
- Brown KA, Pietenpol JA, Moses HL. A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling. *J Cell Biochem*. 2007;101:9-33.
- Brudvik P, Rygh P. The initial phase of orthodontic root resorption incident to local compression of the periodontal ligament. *Eur J Orthod*. 1993a;15:249-63.
- Brudvik P, Rygh P. Non-clast cells start orthodontic root resorption in the periphery of hyalinized zones. *Eur J Orthod*. 1993b;15:467-80.
- Brudvik P, Rygh P. Multi-nucleated cells remove the main hyalinized tissue and start resorption of adjacent root surfaces. *Eur J Orthod*. 1994a;16:265-73.

- Brudvik P, Rygh P. Root resorption beneath the main hyalinized zone. *Eur J Orthod.* 1994b;16:249-63.
- Brunet CL, Sharpe PM, Ferguson MW. Inhibition of TGF-beta 3 (but not TGF-beta 1 or TGF-beta 2) activity prevents normal mouse embryonic palate fusion. *Int J Dev Biol.* 1995;39:345-55.
- Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol.* 2001;22:199-204.
- Bunday RA. Endothelial cell mechanosensitivity. Focus on "Cyclic strain and motion control produce opposite oxidative responses in two human endothelial cell types". *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;293:C33-4.
- Burr DB, Martin RB, Schaffler MB, Radin EL. Bone remodeling in response to in vivo fatigue microdamage. *J Biomech.* 1985;18:189-200.
- Burstone CJ. Application of bioengineering to clinical orthodontics. In: Graber TM, Vanarsdall Jr RL editors: *Orthodontics - Current principles and techniques.* 2nd ed. Mosby Yearbook Inc. St Louis. 1994. p 235-267.
- Burger EH, Klein-Nulen J. Responses of bone cells to biomechanical forces in vitro. *Adv Dent Res.* 1999;13:93-8.
- Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest.* 2000;80:1943-9.
- Campbell JJ, Butcher EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol.* 2000;12:336-41.
- Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev.* 2003;24:218-35.
- Cantarella G, Cantarella R, Caltabiano M, Risuglia N, Bernardini R, Leonardi R. Levels of matrix metalloproteinases 1 and 2 in human gingival crevicular fluid during initial tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;130:568.e11-6.
- Cao Y, Zhou Z, de Crombrughe B, Nakashima K, Guan H, Duan X, Jia SF, Kleinerman ES. Osterix, a transcription factor for osteoblast differentiation, mediates antitumor activity in murine osteosarcoma. *Cancer Res.* 2005;65:1124-8.
- Capelli J Jr, Kantarci A, Haffajee A, Teles RP, Fidel R Jr, Figueredo CM. Matrix metalloproteinases and chemokines in the gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod.* 2011;33:705-11.
- Carano A, Siciliani G. Effects of continuous and intermittent forces on human fibroblasts in vitro. *Eur J Orthod.* 1996;18:19-26.
- Cardaropoli D, Gaviglio L. The Influence of Orthodontic Movement on Periodontal Tissues Level. *Semin Orthod.* 2007;13:234-45.
- Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 1994;84:2068-101.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9:653-60.
- Carmichael NM, Dostrovsky JO, Charlton MP. Enhanced vascular permeability in rat skin induced by sensory nerve stimulation: evaluation of the time course and appropriate stimulation parameters. *Neuroscience.* 2008;153:832-41.
- Casey G. Wound healing-repair at the expense of function. *Nurs N Z.* 2011;17:22-7.
- Chai Y, Zhao J, Mogharei A, Xu B, Bringas P Jr, Shuler C, Warburton D. Inhibition of transforming growth factor-beta type II receptor signaling accelerates tooth formation in mouse first branchial arch explants. *Mech Dev.* 1999;86:63-74.
- Chai Y, Ito Y, Han J. TGF-beta signaling and its functional significance in regulating the fate of cranial neural crest cells. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14:78-88.
- Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res.* 2005;31:599-621.
- Chaudhury A, Howe PH. The tale of transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling: a soigné enigma. *IUBMB Life.* 2009;61:929-39.
- Chawla A, Alatrash G, Wu Y, Mittendorf EA. Immune aspects of the breast tumor microenvironment. *Breast Cancer Manag.* 2013;2:231-244.
- Chen G, Deng C, Li YP. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci.* 2012;8:272-88.
- Chen J, Chen G, Yan Z, Guo Y, Yu M, Feng L, Jiang Z, Guo W, Tian W. TGF- $\beta$ 1 and FGF2 Stimulate the Epithelial-Mesenchymal Transition of HERS Cells Through a MEK-Dependent Mechanism. *J Cell Physiol.* 2014;229:1647-59.

- Chen Y, Xing P, Chen Y, Zou L, Zhang Y, Li F, Lu X. High p-Smad2 expression in stromal fibroblasts predicts poor survival in patients with clinical stage I to IIIA non-small cell lung cancer. *World J Surg Oncol*. 2014;12:328.
- Cherng S, Young J, Ma H. Alpha-Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA). *J Am Sci*. 2008;4:7-9.
- Chernoff AE, Granowitz EV, Shapiro L, Vannier E, Lonnemann G, Angel JB, Kennedy JS, Rabson AR, Wolff SM, Dinarello CA. A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. *J Immunol*. 1995;154:5492-9.
- Cho MI, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol* 2000. 2000;24:9-27.
- Cho MI, Matsuda N, Lin WL, Moshier A, Ramakrishnan PR. In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat. *Calcif Tissue Int*. 1992;50:459-67.
- Choi ME, Ballermann BJ. Inhibition of capillary morphogenesis and associated apoptosis by dominant negative mutant transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem*. 1995;270:21144-50.
- Chu VT, Fröhlich A, Steinhauser G, Scheel T, Roch T, Fillatreau S, Lee JJ, Löhning M, Berek C. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol*. 2011;12:151-9.
- Chu VT, Beller A, Rausch S, Strandmark J, Zänker M, Arbach O, Kruglov A, Berek C. Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. *Immunity*. 2014;40:582-93.
- Chung JY, Do SH, Jeong WI, Jeong DH, Park SJ, Ki MR, Kwak DM, Kim SB, Choi MS, Jeong KS. Effects of bio-active ceramic resources in cutaneous wound healing and the role of TGF-beta signaling. *Mol Cell Biochem*. 2007;295:137-44.
- Cillo JE Jr, Gassner R, Koepsel RR, Buckley MJ. Growth factor and cytokine gene expression in mechanically strained human osteoblast-like cells: implications for distraction osteogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000;90:147-54.
- Cinamon G, Shinder V, Alon R. Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nat Immunol*. 2001;2:515-22.
- Cogan JG, Subramanian SV, Polikandriotis JA, Kelm RJ Jr, Strauch AR. Vascular smooth muscle alpha-actin gene transcription during myofibroblast differentiation requires Sp1/3 protein binding proximal to the MCAT enhancer. *J Biol Chem*. 2002;277:36433-42.
- Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 2006;124:263-6.
- Consolaro A. Biologia da movimentação dentária: princípios básicos aplicados à clínica. In: Interlandi S editor. ortodontia: Bases para a iniciação. 4ª ed. São Paulo: Artes Médicas. 1999. p. 437-49.
- Cook-Mills JM, Deem TL. Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol*. 2005;77:487-95.
- Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*. 2008;180:5771-7.
- Cox G. L-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. *Am J Physiol*. 1996;271:L566-71.
- Coxon A, Rieu P, Barkalow FJ, Askari S, Sharpe AH, von Andrian UH, Arnaout MA, Mayadas TN. A novel role for the  $\beta$ 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity*. 1996;5:653-66.
- Coxon A, Tang T, Mayadas TN. Cytokine-activated endothelial cells delay neutrophil apoptosis in vitro and in vivo. A role for granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 1999;190:923-34.
- Cruvinel WM, Mesquita D Jr, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Silva NP, Andrade LEC. Sistema Imunitário – Parte I: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol*. 2010;50:434-47.
- Cui XM, Chai Y, Chen J, Yamamoto T, Ito Y, Bringas P, Shuler CF. TGF-beta3-dependent SMAD2 phosphorylation and inhibition of MEE proliferation during palatal fusion. *Dev Dyn*. 2003;227:387-94.
- Cutting KF. Wound exudate: composition and functions. *BR J Community Nurs*. 2003;8(9 Suppl):suppl 4-9.
- Dai X, Shen J, Annam NP, Jiang H, Levi E, Schworer CM, Tromp G, Arora A, Higgins M, Wang XF, Yang M, Li HJ, Zhang K, Kuivaniemi H, Li L. SMAD3 deficiency promotes vessel wall remodeling, collagen fiber reorganization and leukocyte infiltration in an inflammatory abdominal aortic aneurysm mouse model. *Sci Rep*. 2015;5:10180.

- Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J Immunol.* 2007;178:6017-22.
- Danilova N. The evolution of Adaptive immunity. In: López-Larrea editor. *Self and nonself – advances in experimental medicine and biology* 738. Austin: Landes Bioscience and Springer & Business Media, LLC, 2012. p. 218-235.
- d'Apuzzo F, Cappabianca S, Ciavarella D, Monsurrò A, Silvestrini-Biavati A, Perillo L. Biomarkers of periodontal tissue remodeling during orthodontic tooth movement in mice and men: overview and clinical relevance. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:105873.
- Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol.* 2007;257:143-79.
- Datto MB, Frederick JP, Pan L, Borton AJ, Zhuang Y, Wang XF. Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction. *Mol Cell Biol.* 1999;19:2495-504.
- Davidovitch Z. Tooth movement. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2:411-50.
- Davidovitch Z. Cell biology associated with orthodontic tooth movement. In: Berkovitz BKB, Moxham BJ, Newman HN editors. *The periodontal ligament in health and disease.* London: Mosby; 1995.
- Davidovitch Z, Montgomery PC, Yost RW, Shanfeld JL. Immuno-histochemical localization of cyclic nucleotides in mineralized tissues: mechanically-stressed osteoblasts in vivo. *Anat Rec.* 1978;192:363-73.
- Davidovitch Z, Okamoto Y, Gogen H, Shanfeld J. Biological response to tooth movements. In: Sachdeva RCL, Bantleon H, White LW, Johnson J editors. *Orthodontics for the next millenium.* Glendora: Ormco, 1997. p.1-30.
- Davies M, Prime SS, Stone AM, Huntley SP, Eveson JW, Paterson IC. Endogenous TGF-beta I inhibits the growth and metastatic dissemination of rat oral carcinoma cell lines but enhances local bone resorption. *J Oral Pathol Med.* 2000;29:232-40.
- Delaine-Smith RM, Green NH, Matcher SJ, MacNeil S, Reilly GC. Monitoring fibrous scaffold guidance of three-dimensional collagen organisation using minimally-invasive second harmonic generation. *PLoS One.* 2014;9:e89761.
- Deng D, Liu W, Xu F, Yang Y, Zhou G, Zhang WJ, Cui L, Cao Y. Engineering human neo-tendon tissue in vitro with human dermal fibroblasts under static mechanical strain. *Biomaterials.* 2009;30:6724-30.
- Derynck R, Akhurst RJ. Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol.* 2007;9:1000-4.
- Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Goeddel DV. The murine transforming growth factor-beta precursor. *J Biol Chem.* 1986;261:4377-9.
- Derynck R, Piek E, Schneider RA, Choy L, Alliston T. TGF- $\beta$  Family Signaling in Mesenchymal Differentiation. 2007 [Internet]. Disponível em: <http://www.irm.ucsf.edu/derynck/documents/212%20Derynck.pdf>
- Di Domenico M, D'apuzzo F, Feola A, Cito L, Monsurrò A, Pierantoni GM, Berrino L, De Rosa A, Polimeni A, Perillo L. Cytokines and VEGF induction in orthodontic movement in animal models. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:201689.
- Diamond MS, Staunton DE, de Fougères AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML, Springer TA. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol.* 1990;111:3129-39.
- Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta I knock out mice. *Development.* 1995;121:1845-54.
- Diercke K, Kohl A, Lux CJ, Erber R. Strain-dependent up-regulation of ephrin-B2 protein in periodontal ligament fibroblasts contributes to osteogenesis during tooth movement. *J Biol Chem.* 2011;286:37651-64.
- Diercke K, König A, Kohl A, Lux CJ, Erber R. Human primary cementoblasts respond to combined IL-1 $\beta$  stimulation and compression with an impaired BSP and CEMP-1 expression. *Eur J Cell Biol.* 2012;91:402-12.
- Domon S, Shimokawa H, Matsumoto Y, Yamaguchi S, Soma K. In situ hybridization for matrix metalloproteinase-1 and cathepsin K in rat root-resorbing tissue induced by tooth movement. *Arch Oral Biol.* 1999;44:907-15.
- Doré M, Korthuis RJ, Granger DN, Entman ML, Smith CW. P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood.* 1993;82:1308-16.
- Doyle JJ, Gerber EE, Dietz HC. Matrix-dependent perturbation of TGF $\beta$  signaling and disease. *FEBS Lett.* 2012;586:2003-15.
- Ducy P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn.* 2000;219:461-71.

- Dudic A, Kiliaridis S, Mombelli A, Giannopoulou C. Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides. *Eur J Oral Sci.* 2006;114:416-22.
- Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7:2495-508.
- Elberg G, Chen L, Elberg D, Chan MD, Logan CJ, Turman MA. MKL1 mediates TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression in human renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294:F1116-28.
- Elberg G, Elberg D, Logan CJ, Chen L, Turman MA. Limitations of commonly used internal controls for real-time RT-PCR analysis of renal epithelial-mesenchymal cell transition. *Nephron Exp Nephrol.* 2006;102:e113-22.
- Eliceiri BP. Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ Res.* 2001;89:1104-10.
- Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem.* 1999;274:37413-20.
- Epker BN, Frost HM. Correlation of bone resorption and formation with the physical behavior of loaded bone. *J Dent Res.* 1965;44:33-41.
- Eskens FA, Dumez H, Hoekstra R, Perschl A, Brindley C, Böttcher S, Wynendaele W, Drevs J, Verweij J, van Oosterom AT. Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins alphavbeta3 and alphavbeta5 in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer.* 2003;39:917-26.
- Ezaki T, Baluk P, Thurston G, La Barbara A, Woo C, McDonald DM. Time course of endothelial cell proliferation and microvascular remodeling in chronic inflammation. *Am J Pathol.* 2001;158:2043-55.
- Fakhrai H, Dorigo O, Shawler DL, Lin H, Mercola D, Black KL, Royston I, Sobol RE. Eradication of established intracranial rat gliomas by transforming growth factor beta antisense gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:2909-14.
- Fakhrai H, Mantil JC, Liu L, Nicholson GL, Murphy-Satter CS, Ruppert J, Shawler DL. Phase I clinical trial of a TGF-beta antisense-modified tumor cell vaccine in patients with advanced glioma. *Cancer Gene Ther.* 2006;13:1052-60.
- Fan JM, Ng YY, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int.* 1999;56:1455-67.
- Felding-Habermann B, O'Toole TE, Smith JW, Fransvea E, Ruggeri ZM, Ginsberg MH, Hughes PE, Pampori N, Shattil SJ, Saven A, Mueller BM. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:1853-8.
- Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:659-93.
- Ferrari G, Cook BD, Terushkin V, Pintucci G, Mignatti P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *J Cell Physiol.* 2009;219:449-58.
- Fill TS, Carey JP, Toogood RW, Major PW. Experimentally determined mechanical properties of, and models for, the periodontal ligament: critical review of current literature. *J Dent Biomech.* 2011;2011:312980.
- Fitzpatrick DR, Denhez F, Kondaiah P, Akhurst RJ. Differential expression of TGF beta isoforms in murine palatogenesis. *Development.* 1990;109:585-95.
- Flajnik MF, Du Pasquier L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends Immunol.* 2004;25:640-4.
- Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol.* 2004;85:47-64.
- Flanders KC, Burmester JK. Medical applications of transforming growth factor-beta. *Clin Med Res.* 2003;1:13-20.
- Flaumenhaft R, Abe M, Sato Y, Miyazono K, Harpel J, Heldin CH, Rifkin DB. Role of the latent TGF-beta binding protein in the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial and smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 1993;120:995-1002.
- Foster BL, Popowicz TE, Fong HK, Somerman MJ. Advances in defining regulators of cementum development and periodontal regeneration. *Curr Top Dev Biol.* 2007;78:47-126.
- Fragioudaki M, Boula A, Tsirakis G, Psarakis F, Spanoudakis M, Papadakis IS, Pappa CA, Alexandrakis MG. B cell-activating factor: its clinical significance in multiple myeloma patients. *Ann Hematol.* 2012;91:1413-8.
- Frantz S, Vincent KA, Feron O, Kelly RA. Innate immunity and angiogenesis. *Circ Res.* 2005;96:15-26.
- Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:7450-4.

- Frost HM. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *Anat Rec.* 1990;226:414-22.
- Frost HM. From Wolff's law to the Utah paradigm: insights about bone physiology and its clinical applications. *Anat Rec.* 2001;262:398-419.
- Frost HM. Bone's mechanostat: a 2003 update. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003;275:1081-101.
- Fujii S, Maeda H, Tomokiyo A, Monnouchi S, Hori K, Wada N, Akamine A. Effects of TGF- $\beta$ 1 on the proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells and a human periodontal ligament stem/progenitor cell line. *ell Tissue Res.* 2010;342:233-42.
- Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Saito M, Akamine A. Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* 2008;215:743-9.
- Fujioka K, Kishida T, Ejima A, Yamamoto K, Fujii W, Murakami K, Seno T, Yamamoto A, Kohno M, Oda R, Yamamoto T, Fujiwara H, Kawahito Y, Mazda O. Inhibition of osteoclastogenesis by osteoblast-like cells genetically engineered to produce interleukin-10. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;456:785-91.
- Fukuda S, Yasu T, Predescu DN, Schmid-Schönbein GW. Mechanisms for regulation of fluid shear stress response in circulating leukocytes. *Circ Res.* 2000;86:E13-8.
- Furcht LT. Critical factors controlling angiogenesis: cell products, cell matrix, and growth factors. *Lab Invest.* 1986;55:505-9.
- Gao J, Symons AL, Bartold PM. Expression of Transforming Growth Factor beta 1 (TGF- $\beta$ ) in the Developing Periodontium of Rats. *J Dent Res.* 1998;77:1708-1716.
- Garant PR. Gingiva. In: Garant PR editor. *Oral cells and tissues.* Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc. 2003a. p. 123-51.
- Garant PR. Periodontal ligament. In: Garant PR editor. *Oral cells and tissues.* Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc, 2003b. p. 153-77.
- Garant PR. Phagocytic cells. In: Garant PR editor. *Oral cells and tissues.* Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc. 2003c. p. 385-417.
- Garg AD, Nowis D, Golab J, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1805:53-71.
- Garlet TP, Coelho U, Silva JS, Garlet GP. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J Oral Sci.* 2007;115:355-62.
- Garlet TP, Coelho U, Repeke CE, Silva JS, Cunha Fde Q, Garlet GP. Differential expression of osteoblast and osteoclast chemoattractants in compression and tension sides during orthodontic movement. *Cytokine.* 2008;42:330-5.
- Gatherer D, Ten Dijke P, Baird DT, Akhurst RJ. Expression of TGF- $\beta$  isoforms during first trimester human embryogenesis. *Development.* 1990;110:445-60.
- Gauldie J, Kolb M, Ask K, Martin G, Bonniaud P, Warburton D. Smad3 signaling involved in pulmonary fibrosis and emphysema. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3:696-702.
- Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res.* 2007;10:149-60.
- Giacomini MM, Travis MA, Kudo M, Sheppard D. Epithelial cells utilize cortical actin/myosin to activate latent TGF- $\beta$  through integrin  $\alpha(v)\beta(6)$ -dependent physical force. *Exp Cell Res.* 2012;318:716-22.
- Giannopoulou C, Cimasoni G. Functional characteristics of gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Dent Res.* 1996;75:895-902.
- Gibbs BF. Basophils as Key Regulators of Allergic Inflammation and Th2-type Immunity. *World Allergy Organ J.* 2008;1:123-8.
- Glaser BM, Michels RG, Kuppermann BD, Sjaarda RN, Pena RA. Transforming growth factor-beta 2 for the treatment of full-thickness macular holes. A prospective randomized study. *Ophthalmology.* 1992;99:1162-72; discussion 1173.
- Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukocyte Biol.* 1994;55:662-75.
- Granger DN, Senchenkova E. Introduction. In: Granger DN, Granger JP editors. *Inflammation and the microcirculation.* San Rafael: Morgan & Claypool Life Sciences, 2010. p. 1-3.

- Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol.* 2000;164:1663-7.
- Gordon KJ, Blobel GC. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1782:197-228.
- Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:46-53.
- Gorouhi F, Maibach HI. Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. *Int J Cosmet Sci.* 2009;31:327-45.
- Goseki T, Shimizu N, Iwasawa T, Takiguchi H, Abiko Y. Effects of in vitro cellular aging on alkaline phosphatase, cathepsin activities and collagen secretion of human periodontal ligament derived cells. *Mech Ageing Dev.* 1996;91:171-83.
- Gotzmann J, Mikula M, Eger A, Schulte-Hermann R, Foisner R, Beug H, Mikulits W. Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat Res.* 2004;566:9-20.
- Goumans MJ, van Zonneveld AJ, ten Dijke P. Transforming growth factor beta-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a switch to cardiac fibrosis? *Trends Cardiovasc Med.* 2008;18:293-8.
- Grieve III WG, Johnson GK, Moore RN, Reinhardt RA, DuBois LM. Prostaglandin (PGE) and interleukin-1b (IL-1b) levels in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1994;105:369-74.
- Groeneveld MC, Everts V, Beertsen W. Formation of afibrillar acellular cementum-like layers induced by alkaline phosphatase activity from periodontal ligament explants maintained in vitro. *J Dent Res.* 1994;73:1588-92.
- Groeneveld MC, Everts V, Beertsen W. Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar: its relation to cementum formation. *J Dent Res.* 1995;74:1374-81.
- Hadj-Salem HM. Method for continuous, controlled application of separating force to rat molar teeth. *Angle Orthod.* 1971;41:76-9.
- Halai K, Whiteford J, Ma B, Nourshargh S, Woodfin A. ICAM-2 facilitates luminal interactions between neutrophils and endothelial cells in vivo. *J Cell Sci.* 2014;127:620-9.
- Hall M, Masella R, Meister M. PDL neuron-associated neurotransmitters in orthodontic tooth movement: identification and proposed mechanism of action. *Today's FDA.* 2001;13:24-5.
- Hall SE, Savill JS, Henson PM, Haslett C. Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *J Immunol.* 1994;153:3218-27.
- Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003;423:349-55.
- Harris SE, Bonewald LF, Harris MA, Sabatini M, Dallas S, Feng JQ, Ghosh-Choudhury N, Wozney J, Mundy GR. Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 1994;9:855-63.
- Hart SP, Rossi AG, Haslett C, Dransfield I. Characterization of the effects of cross-linking of macrophage CD44 associated with increased phagocytosis of apoptotic PMN. *PLoS One.* 2012;7:e33142.
- Hartsough MT, Mulder KM. Transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells. *Pharmacol Ther.* 1997;75:21-41.
- Hasegawa N, Kawaguchi H, Ogawa T, Uchida T, Kurihara H. Immunohistochemical characteristics of epithelial cell rests of Malassez during cementum repair. *J Periodontol Res.* 2003;38:51-6.
- Hayashi K, Igarashi K, Miyoshi K, Shinoda H, Mitani H. Involvement of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2002;122:306-9.
- He W, Cao T, Smith DA, Myers TE, Wang XJ. Smads mediate signaling of the TGFbeta superfamily in normal keratinocytes but are lost during skin chemical carcinogenesis. *Oncogene.* 2001;20:471-83.
- He W, Li AG, Wang D, Han S, Zheng B, Goumans MJ, Ten Dijke P, Wang XJ. Overexpression of Smad7 results in severe pathological alterations in multiple epithelial tissues. *EMBO J.* 2002;21:2580-90.
- Heasman SJ, Giles KM, Ward C, Rossi AG, Haslett C, Dransfield I. Glucocorticoid-mediated regulation of granulocyte apoptosis and macrophage phagocytosis of apoptotic cells: implications for the resolution of inflammation. *J Endocrinol.* 2003;178:29-36.

- Heath JK, Atkinson SJ, Meikle MC, Reynolds JJ. Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. *Biochim Biophys Acta*. 1984;802:151-4.
- Helsing E, Hammarstrom L. The hyaline zone and associated root surface changes in experimental orthodontics in rats: a light and scanning electron microscope study. *Eur J Orthod*. 1996;18:11-8.
- Heng BC, Aubel D, Fussenegger M. An overview of the diverse roles of G-protein coupled receptors (GPCRs) in the pathophysiology of various human diseases. *Biotechnol Adv*. 2013;31:1676-94.
- Heyer J, Escalante-Alcalde D, Lia M, Boettinger E, Edelman W, Stewart CL, Kucherlapati R. Postgastrulation Smad2-deficient embryos show defects in embryo turning and anterior morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:12595-600.
- Hickey MJ, Forster M, Mitchell D, Kaur J, De Caigny C, Kubes P. L-selectin facilitates emigration and extravascular locomotion of leukocytes during acute inflammatory responses in vivo. *J Immunol*. 2000;165:7164-70.
- Hinz B. Tissue stiffness, latent TGF-beta1 activation, and mechanical signal transduction: implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2009;11:120-6.
- Hinz B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech*. 2010;43:146-55.
- Hocevar BA, Brown TL, Howe PH. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J*. 1999;18:1345-56.
- Holmes A, Abraham DJ, Sa S, Shiwen X, Black CM, Leask A. CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem*. 2001;276:10594-601.
- Holzer P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *Gen Pharmacol*. 1998;30:5-11.
- Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsuura M, Ozawa H, Toyama Y, Bonewald LF, Kudo A. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor  $\beta$ . *J Bone Miner Res*. 1999;14:1239-49.
- Hoshi O, Ushiki T. Neutrophil extravasation in rat mesenteric venules induced by the chemotactic peptide N-formyl-methionyl-leucylphenylalanine (fMLP), with special attention to a barrier function of the vascular basal lamina for neutrophil migration. *Arch Histol Cytol*. 2004;67:107-14.
- Hosoya A, Ninomiya T, Hiraga T, Yoshida K, Yoshida N, Kasahara E, Ozawa H, Nakamura H. Potential of periodontal ligament cells to regenerate alveolar bone. *J Oral Biosci*. 2010;52:72-80.
- Hüttemann M, Helling S, Sanderson TH, Sinkler C, Samavati L, Mahapatra G, Varughese A, Lu G, Liu J, Ramzan R, Vogt S, Grossman LI, Doan JW, Marcus K, Lee I. Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1817:598-609.
- Hughes DE, Dai A, Tiffie JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med*. 1996;2:1132-6.
- Hughes FJ, McCulloch CA. Stimulation of the differentiation of osteogenic rat bone marrow stromal cells by osteoblast cultures. *Lab Invest*. 1991;64:617-22.
- Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest*. 2002;109:41-50.
- Iigo Y, Suematsu M, Higashida T, Oheda J, Matsumoto K, Wakabayashi Y, Ishimura Y, Miyasaka M, Takashi T. Constitutive expression of ICAM-1 in rat microvascular systems analyzed by laser confocal microscopy. *Am J Physiol*. 1997;273:H138-47.
- Ionescu CV, Cepinskas G, Savickiene J, Sandig M, Kvietys PR. Neutrophils induce sequential focal changes in endothelial adherens junction components: role of elastase. *Microcirculation*. 2003;10:205-20.
- Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10:205-19.
- Isaka Y, Tsujie M, Ando Y, Nakamura H, Kaneda Y, Imai E, Hori M. Transforming growth factor-beta 1 antisense oligodeoxynucleotides block interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int*. 2000;58:1885-92.
- Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, McNicol A, Cham B, Nishibori M, Bainton DF. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). *Blood*. 1992;80:143-52.

- Ito K, Ye CL, Hibi K, Mitsuoka C, Kannagi R, Hidemura K, Ando H, Kasai Y, Akiyama S, Nakao A. Paired tumor marker of soluble E-selectin and its ligand sialyl Lewis A in colorectal cancer. *J Gastroenterol.* 2001;36:823-9.
- Ito Y, Bringas P Jr, Mogharei A, Zhao J, Deng C, Chai Y. Receptor-regulated and inhibitory Smads are critical in regulating transforming growth factor beta-mediated Meckel's cartilage development. *Dev Dyn.* 2002;224:69-78.
- Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19:176-84.
- Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest.* 2002;110:341-50.
- Iwasaki A, Medzhitov R. Too-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004;5:987-95.
- Iwasaki K, Komaki M, Yokoyama N, Tanaka Y, Taki A, Kimura Y, Takeda M, Oda S, Izumi Y, Morita I. Periodontal ligament stem cells possess the characteristics of pericytes. *J Periodontol.* 2013;84:1425-33.
- Iwata J, Tung L, Urata M, Hacia JG, Pelikan R, Suzuki A, Ramenzoni L, Chaudhry O, Parada C, Sanchez-Lara PA, Chai Y. Fibroblast growth factor 9 (FGF9)-pituitary homeobox 2 (PITX2) pathway mediates transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) signaling to regulate cell proliferation in palatal mesenchyme during mouse palatogenesis. *J Biol Chem.* 2012;287:2353-63.
- Jabalee J, Franz-Odenaal TA. Vascular endothelial growth factor signaling affects both angiogenesis and osteogenesis during the development of scleral ossicles. *Dev Biol.* 2015 Jul 22. pii: S0012-1606(15)30058-0. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.07.014. [Epub ahead of print]
- Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J.* 1997;11:457-65.
- Jacobsen KA, Al-Aql ZS, Wan C, Fitch JL, Stapleton SN, Mason ZD, Cole RM, Gilbert SR, Clemens TL, Morgan EF, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Bone formation during distraction osteogenesis is dependent on both VEGFR1 and VEGFR2 signaling. *J Bone Miner Res.* 2008;23:596-609.
- James JA, Irwin CR, Linden GJ. Gingival fibroblast response to cyclosporin A and transforming growth factor beta 1. *J Periodontal Res.* 1998;33:40-8.
- Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.
- Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev.* 2005;26:743-74.
- Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res.* 1998;13:793-802.
- Jin XL, Li XH, Zhang LM, Zhao J. The interaction of leukocytes and adhesion molecules in mesenteric microvessel endothelial cells after internal capsule hemorrhage. *Microcirculation.* 2012;19:539-46.
- Johnson RB. Osteoclast distribution within the rat interdental septum coincident to experimental tooth movement using light forces. *Anat Rec (Hoboken).* 2007;290:74-82.
- Johnson RL, Ziff M. Lymphokine stimulation of collagen accumulation. *J Clin Invest.* 1976;58:240-52.
- Jourdeuil K, Franz-Odenaal TA. Vasculogenesis and the induction of skeletogenic condensations in the avian eye. *Anat Rec (Hoboken).* 2012;295:691-8.
- Juan H. Dependence of histamine-evoked nociception on prostaglandin release. *Agents Actions.* 1981;11:706-10.
- Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 2003;112:1776-84.
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119:1420-8.
- Kang JS, Alliston T, Delston R, Derynck R. Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3. *EMBO J.* 2005;24:2543-55.
- Kannaiyan R, Surana R, Shin EM, Ramachandran L, Sethi G, Kumar AP. Targeted inhibition of multiple proinflammatory signalling pathways for the prevention and treatment of multiple myeloma. In: Gupta A editor. Multiple myeloma - an overview (Internet). 2012. ISBN: 978-953-307-768-0, InTech, DOI: 10.5772/30444. Disponible em: <http://www.intechopen.com/books/multiple-myeloma-an-overview/targeted-inhibition-of-multiple-proinflammatory-signaling-pathways-for-the-prevention-and-treatment->
- Kanaan RA, Kanaan LA. Transforming growth factor-beta 1, bone connection. *Med Sci Monit.* 2006;12:164-169.

- Karasuyama H, Mukai K, Obata K, Tsujimura Y, Wada T. Nonredundant roles of basophils in immunity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:45-69.
- Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 1995;270:16483-6.
- Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res.* 2002;17:210-20.
- Keelan ET, License ST, Peters AM, Binns RM, Haskard DO. Characterization of E-selectin expression in vivo with use of a radiolabeled monoclonal antibody. *Am J Physiol.* 1994;266:H278-H90.
- Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MB, Fauci AS. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med.* 1986;163:1037-50.
- Keogh MC, Chen D, Schmitt JF, Dennehy U, Kakkar VV, Lemoine NR. Design of a muscle cell-specific expression vector utilising human vascular smooth muscle alpha-actin regulatory elements. *Gene Ther.* 1999;6:616-28.
- Khachigian LM, Resnick N, Gimbrone MA Jr, Collins T. Nuclear factor-kappa B interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress. *J Clin Invest.* 1995;96:1169-75.
- Khachigian LM, Anderson KR, Halnon NJ, Gimbrone MA Jr, Resnick N, Collins T. Egr-1 is activated in endothelial cells exposed to fluid shear stress and interacts with a novel shear-stress-response element in the PDGF A-chain promoter. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2280-6.
- Khalil N. TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect.* 1999;1:1255-63.
- Khatami M. Chronic Inflammation: Synergistic Interactions of Recruiting Macrophages (TAMs) and Eosinophils (Eos) with Host Mast Cells (MCs) and Tumorigenesis in CALTs. M-CSF, Suitable Biomarker for Cancer Diagnosis! *Cancers (Basel).* 2014;6:297-322.
- Kim MS, Day CJ, Selinger CI, Magno CL, Stephens SR, Morrison NA. MCP-1-induced human osteoclast-like cells are tartrate-resistant acid phosphatase, NFATc1, and calcitonin receptor-positive but require receptor activator of NFkappaB ligand for bone resorption. *J Biol Chem.* 2006;281:1274-85.
- Kim SG, Kim HA, Jong HS, Park JH, Kim NK, Hong SH, Kim TY, Bang YJ. The endogenous ratio of Smad2 and Smad3 influences the cytostatic function of Smad3. *Mol Biol Cell.* 2005;16:4672-83.
- Kim WS, Lee JS, Bae GY, Kim JJ, Chin YW, Bahk YY, Min HG, Cha HJ. Extract of *Aneilema keisak* inhibits transforming growth factor-beta-dependent signalling by inducing Smad2 downregulation in keloid fibroblasts. *Exp Dermatol.* 2013;22:69-71.
- Kim Y, Lee S, Kim YS, Lawler S, Gho YS, Kim YK, Hwang HJ. Regulation of Th1/Th2 cells in asthma development: a mathematical model. *Math Biosci Eng.* 2013;10:1095-133.
- Kimoto S, Matsuzawa M, Matsubara S, Komatsu T, Uchimura N, Kawase T, Saito S. Cytokine secretion of periodontal ligament fibroblasts derived from human deciduous teeth: effect of mechanical stress on the secretion of transforming growth factor-beta 1 and macrophage colony stimulating factor. *Periodontal Res.* 1999;34:235-43.
- Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Miyazaki M. Immunosuppression following surgical and traumatic injury. *Surg Today.* 2010;40:793-808.
- King GJ, Keeling SD, Wronski TJ. Histomorphometric study of alveolar bone turnover in orthodontic tooth movement. *Bone.* 1991;12:401-9.
- Kissin EY, Lemaire R, Korn JH, Lafyatis R. Transforming growth factor beta induces fibroblast fibrillin-1 matrix formation. *Arthritis Rheum.* 2002;46:3000-9.
- Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev.* 2004;84:649-98.
- Knoll BI, McCarthy TL, Centrella M, Shin J. Strain-dependent control of transforming growth factor-beta function in osteoblasts in an in vitro model: biochemical events associated with distraction osteogenesis. *Plast Reconstr Surg.* 2005;116:224-33.

- Kobayashi Y, Takagi H, Sakai H, Hashimoto F, Matakai S, Kobayashi K, Kato Y. Effects of local administration of osteocalcin on experimental tooth movement. *Angle Orthod.* 1998;68:259-66.
- Kohno T, Matsumoto Y, Kanno Z, Warita H, Soma K. Experimental tooth movement under light orthodontic forces: rates of tooth movement and changes of the periodontium. *J Orthod.* 2002;29:129-35.
- Kono K, Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Yamamoto N, Wada N, Monnouchi S, Teramatsu Y, Hamano S, Koori K, Akamine A. Exposure to transforming growth factor- $\beta$ 1 after basic fibroblast growth factor promotes the fibroblastic differentiation of human periodontal ligament stem/progenitor cell lines. *Cell Tissue Res.* 2013;352:249-63.
- Komatsu K, Kanazashi M, Shimada A, Shibata T, Viidik A, Chiba M. Effects of age on the stress-strain and stress-relaxation properties of the rat molar periodontal ligament. *Arch Oral Biol.* 2004;49:817-24.
- Komorori T, Kishimoto T. Cbfa1 in bone development. *Curr Opin Genet Dev.* 1998;8:494-9.
- Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:279-89.
- Koyama Y, Mitsui N, Suzuki N, Yanagisawa M, Sanuki R, Isokawa K, Shimizu N, Maeno M. Effect of compressive force on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in osteoblastic Saos-2 cells. *Arch Oral Biol.* 2008;53:488-96.
- Kragh T, Napoleone M, Fallah MA, Gritsch H, Schneider MF, Reininger AJ. High Shear Dependent von Willebrand Factor Self-assembly Fostered by Platelet Interaction and Controlled by ADAMTS13. *Thromb Res.* 2014;133:1079-87.
- Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;129:469e.1-469e.32.
- Krishnan V, Davidovitch Z. On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2009;88:597-608.
- Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN, Vandenabeele P. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol.* 2011;32:157-64.
- Krysko O, Løve Aaes T, Bachert C, Vandenabeele P, Krysko DV. Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell Death Dis.* 2013;4:e631.
- Kubota A, Hasegawa K, Suguro T, Koshihara Y. Tumor necrosis factor-alpha promotes the expression of osteoprotegerin in rheumatoid synovial fibroblasts. *J Rheumatol.* 2004;31:426-35.
- Kuitert RB. Orthodontic treatment for adults. *Ned Tijdschr Tandheelkd.* 2000;107:160-8.
- Kumar AH, Martin K, Turner EC, Buneker CK, Dorgham K, Deterre P, Caplice NM. Role of CX3CR1 receptor in monocyte/macrophage driven neovascularization. *PLoS One.* 2013;8:e57230.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Chronic inflammation. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC editors. *Robbins basic pathology*. 9th ed. Elsevier [Intenet]. 2012. ISBN-13. Available from: <https://www.inkling.com/read/robbins-basic-pathology-kumar-abbas-aster-9th/chapter-2/chronic-inflammation>.
- Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol.* 1990;144:4226-30.
- Kuroi J, Owman-Moll P. Hyalinization and root resorption during early orthodontic tooth movement in adolescents. *Angle Orthod.* 1998;68:161-5.
- Kyomen S, Tanne K. Influences of aging changes in proliferative rate of PDL cells during experimental tooth movement in rats. *Angle Orthod.* 1997;67:67-72.
- Kvam E. A study of the cell-free zone following experimental tooth movement in the rat. *Rep Congr Eur Orthod Soc.* 1969;419-34.
- Lacativa PG, Farias ML. Osteoporosis and inflammation. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010;54:123-32.
- Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest.* 2000;106:1481-8.
- Lam PY, Huttenlocher A. Interstitial leukocyte migration in vivo. *Curr Opin Cell Biol.* 2013;25:650-8.
- Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher E. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev.* 2002;186:37-46.
- Lawrence T, Gilroy DW. Chronic inflammation: a failure of resolution? *Int J Exp Pathol.* 2007;88:85-94.

- Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 2004;18:816-27.
- Lee MB. Bone morphogenetic proteins: background and implications for oral reconstruction. A review. *J Clin Periodontol.* 1997;24:355-65.
- Leeper-Woodford SK, Detmer K. Acute hypoxia increases alveolar macrophage tumor necrosis factor activity and alters NF-kappaB expression. *Am J Physiol.* 1999;276(6 Pt 1):L909-16.
- Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec.* 1996;245:327-41.
- Lembeck F, Donnerer J, Tsuchiya M, Nagahisa A. The non-peptide tachykinin antagonist, CP-96,345, is a potent inhibitor of neurogenic inflammation. *Br J Pharmacol.* 1992;105:527-30.
- Lendorf ME, Manon-Jensen T, Kronqvist P, Multhaupt HA, Couchman JR. Syndecan-1 and syndecan-4 are independent indicators in breast carcinoma. *J Histochem Cytochem.* 2011;59:615-29.
- Leong NL, Hurng JM, Djomehri SI, Gansky SA, Ryder MI, Ho SP. Age-related adaptation of bone-PDL-tooth complex: Rattus-Norvegicus as a model system. *PLoS One.* 2012;7:e35980.
- Leprince JGI, Zeitlin BD, Tolar M, Peters OA. Interactions between immune system and mesenchymal stem cells in dental pulp and periapical tissues. *Int Endod J.* 2012;45:689-701.
- Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med.* 2003;9:263-8.
- Li J, Tsuji K, Komori T, Miyazono K, Wrana JL, Ito Y, Nifuji A, Noda M. Smad2 overexpression enhances Smad4 gene expression and suppresses Cbfa1 gene expression in osteoblastic osteosarcoma ROS17/2.8 cells and primary rat calvaria cells. *J Biol Chem.* 1998;273:31009-15.
- Li L, Zhu Z, Xiao W, Li L. Multi-walled carbon nanotubes promote cementoblast differentiation and mineralization through the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway. *Int J Mol Sci.* 2015;16:3188-201.
- Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell.* 2008;134:392-404.
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2006a;24:99-146.
- Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity.* 2006b;25:455-71.
- Li W, Liu T, Wu L, Chen C, Jia Z, Bai X, Ruan D. Blocking the function of inflammatory cytokines and mediators by using IL-10 and TGF- $\beta$ : a potential biological immunotherapy for intervertebral disc degeneration in a beagle model. *Int J Mol Sci.* 2014;15:17270-83.
- Lian N, Lin T, Liu W, Wang W, Li L, Sun S, Nyman JS, Yang X. Transforming growth factor  $\beta$  suppresses osteoblast differentiation via the vimentin activating transcription factor 4 (ATF4) axis. *J Biol Chem.* 2012;287:35975-84.
- Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev.* 2007;65:S140-6.
- Liberati NT, Datto MB, Frederick JP, Shen X, Wong C, Rougier-Chapman EM, Wang XF. Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:4844-9.
- Lilja E, Lindskog S, Hammarström L. Histochemistry of enzymes associated with tissue degradation incident to orthodontic tooth movement. *Am J Orthod.* 1983;83:62-75.
- Lindauer SJ, Britto AD. Biological response to biomechanical signals: orthodontic mechanics to control tooth movement. *Semin Orthod.* 2000;6:145-54.
- Linkhart TA, Linkhart SG, MacCharles DC, Long DL, Strong DD. Interleukin-6 messenger RNA expression and interleukin-6 protein secretion in cells isolated from normal human bone: regulation by interleukin-1. *J Bone Miner Res.* 1991;6:1285-94.
- Liu HW, Yacobi R, Savion N, Narayanan AS, Pitaru S. A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue-forming cell lineage of the periodontal ligament. *J Bone Miner Res.* 1997;12:1691-9.
- Liu JW, Lacy J, Sukhatme VP, Coleman DL. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces transcriptional activation of Egr-1 in murine peritoneal macrophages. *J Biol Chem.* 1991;266:5929-33.
- Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Amon A. Immunology. In: McHenry B, Tontonoz M, Frost EP, Champon E, Rolfe M editors. *Molecular cell biology.* 7th ed. New York: W. H. Freeman and Company. 2013. p. 1059-1112.

- Long DS, Smith ML, Pries AR, Ley K, Damiano ER. Microviscometry reveals reduced blood viscosity and altered shear rate and shear stress profiles in microvessels after hemodilution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:10060-5.
- Long P, Hu J, Piesco N, Buckley M, Agarwal S. Low magnitude of tensile strain inhibits IL-1beta-dependent induction of pro-inflammatory cytokines and induces synthesis of IL-10 in human periodontal ligament cells in vitro. *J Dent Res*. 2001;80:1416-20.
- Lowney JJ, Norton LA, Shafer DM, Rossomando EF. Orthodontic forces increase tumor necrosis factor alpha in the human gingival sulcus. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1995;108:519-24.
- Lu X, Tan CK, Zhou JQ, You M, Carastro LM, Downey KM, So AG. Direct interaction of proliferating cell nuclear antigen with the small subunit of DNA polymerase delta. *J Biol Chem*. 2002;277:24340-5.
- Mabuchi R, Matsuzaka K, Shimono M. Cell proliferation and cell death in periodontal ligaments during orthodontic tooth movement. *J Periodontol Res*. 2002;37:118-24.
- Macapanpan LC, Weinmann JP, Brodie AG. Early tissue changes following tooth movement in rats. *Angle Orthod*. 1954;24:79-95.
- Madri JA, Pratt BM, Tucker AM. Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor-beta depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. *J Cell Biol*. 1988;106:1375-84.
- Maeda H, Wada N, Fujii S, Tomokiyo A, Akamine A. Periodontal Ligament Stem Cells. In: Gholamrezanezhad A editor. *Stem Cells in Clinic and Research*. 2011 [Internet]. ISBN 978-953-307-797-0. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/howtoreference/stem-cells-in-clinic-and-research/periodontal-ligament-stem-cells>.
- Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci*. 2003;116:3051-60.
- Mahabeleshwar GH, Feng W, Phillips DR, Byzova TV. Integrin signaling is critical for pathological angiogenesis. *J Exp Med*. 2006;203:2495-507.
- Mahadeva R, Shapiro SD. Chronic obstructive pulmonary disease \* 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax*. 2002;57:908-14.
- Mailhot JM, Schuster GS, Garnick JJ, Hanes PJ, Lapp CA, Lewis JB. Human periodontal ligament and gingival fibroblast response to TGF-beta 1 stimulation. *J Clin Periodontol*. 1995;22:679-85.
- Majno G. *The Healing Hand - Man and wound in the ancient world*. Cambridge, MA: Harvard University Press; 1975.
- Majno G. Chronic inflammation: links with angiogenesis and wound healing. *Am J Pathol*. 1998;153:1035-9.
- Maló L, Cabrita A, Rafael A. Movimento ortodôntico; avaliação do movimento ortodôntico num estudo experimental em ratas wistar adultas. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac*. 2014;55:152-8.
- Maltman J, Pragnell IB, Graham GJ. Specificity and reciprocity in the interactions between TGF-beta and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *J Immunol*. 1996;156:1566-71.
- Manz MG, Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:302-14.
- Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology*. 2014;147:577-594.e1.
- Martin M, Lefaix J, Delanian S. TGF-beta 1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;47:277-90.
- Martínez-Borra J, González S, López-Larrea C. The origin of the bacterial immune response. In: López-Larrea C editor. *Self and nonself – advances in experimental medicine and biology 738*. Austin: Landes Bioscience and Springer+Business Media, LLC, 2012. p. 1-13.
- Masella RS, Meister M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006;129:458-68.
- Massagué J. TGFβ signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:616-30.
- Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. 2000;103:295-309.
- Massagué J, Gomis RR. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett*. 2006;580:2811-20.
- Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev*. 2005;19:2783-810.
- Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J*. 2000;19:1745-54.
- Matheny HE, Deem TL, Cook-Mills JM. Lymphocyte migration through monolayers of endothelial cell lines involves VCAM-1 signaling via endothelial cell NADPH oxidase. *J Immunol*. 2000;164:6550-9.

- Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, Yoneda T. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2008;283:29119-25.
- Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473:201-9.
- Mayahara K, Yamaguchi A, Takenouchi H, Kariya T, Taguchi H, Shimizu N. Osteoblasts stimulate osteoclastogenesis via RANKL expression more strongly than periodontal ligament cells do in response to PGE(2). *Arch Oral Biol.* 2012;57:1377-84.
- Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev.* 2006;86:279-367.
- McCartney-Francis NL, Wahl SM. Transforming growth factor beta: a matter of life and death. *J Leukoc Biol.* 1994;55:401-9.
- McCulloch CAG. Progenitor cell populations in the periodontal ligamento of mice. *Anat Rec.* 1985;21:258-62.
- McCulloch CAG, Melcher AH. Cell density and cell generation in the periodontal ligamento of mice. *Am J Anat.* 1983;167:43-58.
- McDonald DM. Endothelial gaps and permeability of venules in rat tracheas exposed to inflammatory stimuli. *Am J Physiol.* 1994;266:L61-83.
- McDonald DM, Thurston G, Baluk P. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. *Microcirculation.* 1999;6:7-22.
- Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell.* 2010;140:771-6.
- Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med.* 2000;343:338-44.
- Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev.* 2006;86:279-367.
- Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod.* 2006;28:221-40.
- Melsen B. Biological reaction of alveolar bone to orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 1999;69:151-8.
- Melsen B. Tissue reaction to orthodontic tooth movement-a new paradigm. *Eur J Orthod.* 2001;23:671-81.
- Merwin JR, Anderson JM, Kocher O, Van Itallie CM, Madri JA. Transforming growth factor beta 1 modulates extracellular matrix organization and cell-cell junctional complex formation during in vitro angiogenesis. *J Cell Physiol.* 1990;142:117-28.
- Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol.* 2012;32:463-88.
- Mills CD, Lenz LL, Ley K. Macrophages at the fork in the road to health or disease. *Front Immunol.* 2015;6:59.
- Moazzam F, DeLano FA, Zweifach BW, Schmid-Schönbein GW. The leukocyte response to fluid stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:5338-43.
- Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:240-73.
- Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* 2001;108:601-9.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765.
- Moraes FF, Chavez VEA, Fava M: Fundamentos histológicos aplicados à ortodontia. In: Interlandi S. Bases para a iniciação. 4ª ed. São Paulo: Artes Médicas, Divisão Odontológica. 1999. p. 43-52.
- Mori Y, Chen SJ, Varga J. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2003;48:1964-78.
- Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S, Tominaga M. Sensitization of TRPV1 by EPI and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol Pain.* 2005;1:3.
- Moustakas A. Smad signalling network. *J Cell Sci.* 2002;115:3355-6.
- Mukai M, Yoshimine Y, Akamine A, Maeda K. Bone-like nodules formed in vitro by rat periodontal ligament cells. *Cell Tissue Res.* 1993;271:453-60.
- Muller WA. How endothelial cells regulate transmigration of leukocytes in the inflammatory response. *Am J Pathol.* 2014;184:886-96.
- Munro JM, Lo SK, Corless C, Robertson MJ, Lee NC, Barnhill RL, Weinberg DS, Bevilacqua MP. Expression of sialyl-Lewis X, an E-selectin ligand, in inflammation, immune processes, and lymphoid tissues. *Am J Pathol.* 1992;141:1397-408.

- Muraoka RI, Nakano K, Kurihara S, Yamada K, Kawakami T. Immunohistochemical expression of heat shock proteins in the mouse periodontal tissues due to orthodontic mechanical stress. *Eur J Med Res.* 2010;15:475-82.
- Murphy HS. Inflammation. In: Rubin R, Strayer DS, Rubin E editors. *Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine.* 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2012. p. 47-82.
- Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:723-37.
- Nagai M, Yoshida A, Sato N, Wong DT. Messenger RNA level and protein localization of transforming growth factor-beta 1 in experimental tooth movement in rats. *Eur J Oral Sci.* 1999;107:475-81.
- Nagarajan RP, Chen Y. Structural basis for the functional difference between Smad2 and Smad3 in FAST-2 (forkhead activin signal transducer-2)-mediated transcription. *Biochem J.* 2000;350:253-9.
- Nagarajan RP, Liu J, Chen Y. Smad3 inhibits transforming growth factor-beta and activin signaling by competing with Smad4 for FAST-2 binding. *J Biol Chem.* 1999;274:31229-35.
- Nam H, Kim J, Park J, Park JC, Kim JW, Seo BM, Lee JC, Lee G. Expression profile of the stem cell markers in human Hertwig's epithelial root sheath/Epithelial rests of Malassez cells. *Mol Cells.* 2011;31:355-60.
- Nanci A, Kuroda S, Schmittbuhl M, Wazen R. Repair and regeneration of oral tissues. In: Nanci A editor. *Ten Cate's oral histology: development, structure and function.* 8th ed. Mosby, Inc. 2013. p. 278-310.
- Nanci A, Somerman MJ. Periodontium. In: Nanci A editor. *Ten Cate's oral histology: development, structure and function.* 8th ed. Mosby, Inc. 2013. p. 240-274.
- Nakagawa T, Li JH, Garcia G, Mu W, Piek E, Böttinger EP, Chen Y, Zhu HJ, Kang DH, Schreiner GF, Lan HY, Johnson RJ. TGF-beta induces proangiogenic and antiangiogenic factors via parallel but distinct Smad pathways. *Kidney Int.* 2004;66:605-13.
- Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest.* 1987;79:319-26.
- Nawshad A, LaGamba D, Hay ED. Transforming growth factor beta (TGFbeta) signalling in palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT). *Arch Oral Biol.* 2004;49:675-89.
- Nayak BN, Galil KA, Wiltshire W, Lekic PC. Molecular Biology of Orthodontic Tooth Movement. *J Dent Oral Health.* 2013;101:1-6.
- Neidlinger-Wilke C, Stalla I, Claes L, Brand R, Hoellen I, Rübenacker S, Arand M, Kinz L. Human osteoblasts from younger normal and osteoporotic donors show differences in proliferation and TGF beta-release in response to cyclic strain. *J Biomech.* 1995;28:1411-8.
- Newton JP, Buckley CD, Jones EY, Simmons DL. Residues on both faces of the first immunoglobulin fold contribute to homophilic binding sites of PECAM-1/CD31. *J Biol Chem.* 1997;272:20555-63.
- Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4:a006049.
- Nishimura M, Chiba M, Ohashi T, Sato M, Shimizu Y, Igarashi K, Mitani H. Periodontal tissue activation by vibration: intermittent stimulation by resonance vibration accelerates experimental tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;133:572-83.
- Nohutcu RM, McCauley LK, Koh AJ, Somerman MJ. Expression of extracellular matrix proteins in human periodontal ligament cells during mineralization in vitro. *J Periodontol.* 1997;68:320-7.
- Nomura M, Li E. Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature.* 1998;393:786-90.
- Nör JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol.* 1999;154:375-84.
- Norton LA, Andersen KL, Arenholt-Bindslev D, Melsen B. Simulated orthodontic strain applied to human PDL using an in vitro model. In: Davidovitch Z editor. *Biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation.* Ohio: The Ohio State University, College of Dentistry. 1992. p. 211-220.
- Noyes FB. The contribution of Albin Oppenheim to orthodontia. *Angle Orthod.* 1945;15:47-51.
- Nunes I, Gleizes PE, Metz CN, Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor-beta. *J Cell Biol.* 1997;136:1151-63.

- Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E. TGF-beta I and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev.* 1996;10:2462-77.
- Ogata Y, Niisato N, Sakurai T, Furuyama S, Sugiyama H. Comparison of the characteristics of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Periodontol.* 1995;66:1025-31.
- Ogiso B, Hughes FJ, Davies JE, McCulloch CA. Fibroblastic regulation of osteoblast function by prostaglandins. *Cell Signal.* 1992;4:627-39.
- Ohashi KL, Tung DK, Wilson J, Zweifach BW, Schmid-Schönbein GW. Transvascular and interstitial migration of neutrophils in rat mesentery. *Microcirculation.* 1996;3:199-210.
- Oka K, Oka S, Sasaki T, Ito Y, Bringas P Jr, Nonaka K, Chai Y. The role of TGF-beta signaling in regulating chondrogenesis and osteogenesis during mandibular development. *Dev Biol.* 2007;303:391-404.
- Okada T, Ngo VN, Ekland EH, Förster R, Lipp M, Littman DR, Cyster JG. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med.* 2002;196:65-75.
- Ono Y, Sensui H, Okutsu S, Nagatomi R. Notch2 negatively regulates myofibroblastic differentiation of myoblasts. *J Cell Physiol.* 2007;210:358-69.
- Oppenheim A. Bone changes during tooth movement. *Internat J Ortodontia.* 1930;16:535-51.
- Oshiro A, Iseki S, Miyauchi M, Terashima T, Kawaguchi Y, Ikeda Y, Shinomura T. Lipopolysaccharide induces rapid loss of follicular dendritic cell-secreted protein in the junctional epithelium. *J Periodontal Res.* 2012;47:689-94.
- Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol.* 1999;515:287-91.
- Oursler MJ. Osteoclast synthesis and secretion and activation of latent transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res.* 1994;9:443-52.
- Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Dorf M, Littman DR, Rollins BJ, Zweerink H, Rot A, von Andrian UH. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med.* 2001;194:1361-73.
- Pakosz K, Zakliczyński M, Król W, Pyka L, Zakliczyńska H, Trybunia D, Wiench R, Ilewicz L, Skrzep-Poloczek B, Przybylski R, Zembala M. Association of transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF-  $\beta$ 1) with gingival hyperplasia in heart transplant patients undergoing cyclosporine-A treatment. *Ann Transplant.* 2012;17:45-52.
- Palaniyandi SS, Watanabe K, Ma M, Tachikawa H, Kodama M, Aizawa Y. Inhibition of mast cells by interleukin-10 gene transfer contributes to protection against acute myocarditis in rats. *Eur J Immunol.* 2004;34:3508-15.
- Pan J, Wang T, Wang L, Chen W, Song M. Cyclic strain-induced cytoskeletal rearrangement of human periodontal ligament cells via the Rho signaling pathway. *PLoS One.* 2014;9:e91580.
- Parlange LM, Sims MR. A.T.E.M. stereological analysis of blood vessels and nerves in marmoset periodontal ligament following endodontics and magnetic incisor extrusion. *Eur J Orthod.* 1993;15:33-44.
- Pavithra AS, Prashanth GS, Mathew S, Shekar SE. Analysis of stress in the periodontal ligament and alveolar bone of the maxillary first molars during intrusion with microscrews implants: a 3D finite element study. *World J Dent.* 2014;5:11-16.
- Persson M. A 100th anniversary: Sandstedt's experiments on tissue changes during tooth movement. *J Orthod.* 2005;32:27-8.
- Petzold T, Orr AW, Hahn C, Jhaveri KA, Parsons JT, Schwartz MA. Focal adhesion kinase modulates activation of NF-kappaB by flow in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;297:C814-22.
- Pfeilschifter J, Mundy GR. Modulation of type beta transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:2024-8.
- Piek E, Ju WJ, Heyer J, Escalante-Alcalde D, Stewart CL, Weinstein M, Deng C, Kucherlapati R, Bottinger EP, Roberts AB. Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts. *J Biol Chem.* 2001;276:19945-53.
- Pinhal-Enfield G, Ramanathan M, Hasko G, Vogel SN, Salzman AL, Boons GJ, Leibovich SJ. An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A(2A) receptors. *Am J Pathol.* 2003;163:711-21.

- Pinkerton MN, Wescott DC, Gaffey BJ, Beggs KT, Milne TJ, Meikle MC. Cultured human periodontal ligament cells constitutively express multiple osteotropic cytokines and growth factors, several of which are responsive to mechanical deformation. *J Periodontal Res.* 2008;43:343-51.
- Plataki M, Tzortzaki E, Rytala P, Demosthenes M, Koutsopoulos A, Siafakas NM. Apoptotic mechanisms in the pathogenesis of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2006;1:161-71.
- Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 1987;165:251-6.
- Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem.* 2000;275:21785-8.
- Plüddemann A, Neyen C, Gordon S. Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods.* 2007;43:207-17.
- Ponte EV, Rizzo JA, Cruz AA. Interrelationship among asthma, atopy, and helminth infections. *J Bras Pneumol.* 2007;33:335-42.
- Pollman MJ, Naumovski L, Gibbons GH. Endothelial cell apoptosis in capillary network remodeling. *J Cell Physiol.* 1999;178:359-70.
- Predrag Lekic, Jaro Sodek, Christopher A.G. McCulloch. Relationship of cellular proliferation to expression of osteopontin and bone sialoprotein in regenerating rat periodontium. *Cell Tissue Res.* 1996;285:491-500.
- Pries AR, Kuebler WM. Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;176:1-40.
- Prime SS, Pring M, Davies M, Paterson IC. TGF-beta signal transduction in oro-facial health and non-malignant disease (part I). *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15:324-36.
- Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J, Ferguson MW, Doetschman T. Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet.* 1995;11:409-14.
- Proffit WR, Fields HW. The biological basis of orthodontic therapy. In: Proffit WR, Fields HW editors. *Contemporary orthodontics.* 3rd ed. St. Louis: Mosby, Inc. 2000. p 296-325.
- Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodek J, Cho MI. Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro. *Calcif Tissue Int.* 1995;57:52-9.
- Rapuano BE, Bockman RS. Tumor necrosis factor-alpha stimulates phosphatidylinositol breakdown by phospholipase C to coordinately increase the levels of diacylglycerol, free arachidonic acid and prostaglandins in an osteoblast (MC3T3-E1) cell line. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1091:374-84.
- Redlich M, Roos H, Reichenberg E, Zaks B, Grosskop A, Bar Kana I, Pitaru S, Palmon A. The effect of centrifugal force on mRNA levels of collagenase, collagen type-I, tissue inhibitors of metalloproteinases and beta-actin in cultured human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2004;39:27-32.
- Reitan K. The Tissue reaction as related to the age factor. *D Record.* 1954;74:271.
- Reitan K. Tissue behavior during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod.* 1960;46:881-900.
- Reitan K. Effects of force magnitude and direction of tooth movement on different alveolar bone types. *Angle Orthod.* 1964;34:244-55.
- Reitan K. Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. *Am J Orthod.* 1967;53:721-45.
- Reitan K. Biomechanical principles and reactions. In: Graber TM, Swan BF editors. *Current orthodontic concepts and techniques.* 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 1975. p. 111-229.
- Reitan K, Kvam E. Comparative behavior of human and animal tissue during experimental tooth movement. *Angle Orthod.* 1971;41:1-14.
- Ren Y, Hazemeijer H, de Haan B, Qu N, de Vos P. Cytokine profiles in crevicular fluid during orthodontic tooth movement of short and long durations. *J Periodontol.* 2007;78:453-8.
- Ren Y, Vissink A. Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. *Eur J Oral Sci.* 2008;116:89-97.
- Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. The rat as a model for orthodontic tooth movement-a critical review and a proposed solution. *Eur J Orthod.* 2004;26:483-90.

- Reusch P, Wagdy H, Reusch R, Wilson E, Ives HE. Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1996;79:1046-53.
- Ribeiro JS, Maciel JV, Knop LA, Machado MÁ, Grégio AM, Camargo ES. Effect of growth hormone in experimental tooth movement. *Braz Dent J.* 2013;24:503-7.
- Rickert P, Weiner OD, Wang F, Bourne HR, Servant G. Leukocytes navigate by compass: roles of PI3Kgamma and its lipid products. *Trends Cell Biol.* 2000;10:466-73.
- Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:986-1000.
- Ripamonti U, Parak R, Petit JC. Induction of cementogenesis and periodontal ligament regeneration by recombinant human transforming growth factor-beta3 in Matrigel with rectus abdominis responding cells. *J Periodontal Res.* 2009;44:81-7.
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fauci, AS. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:4167-71.
- Roberts WE, Chase DC. Kinetics of cell proliferation and migration with orthodontically-induced osteogenesis. *J Dent Res.* 1981;60:174-81.
- Roberts-Harry D, Sandy J. Orthodontics. Part 11: orthodontic tooth movement. *Br Dent J.* 2004;196:391-4; quiz 426.
- Rody WJ Jr, King GJ, Gu G. Osteoclast recruitment to sites of compression in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;120:477-89.
- Romo GM, Dong JF, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV, Berndt MC, López JA. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med.* 1999;190:803-14.
- Rosen SD, Bertozzi CR. The selectins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol.* 1994;6:663-73.
- Rosenbloom AJ, Linden PK, Dorrance A, Penkosky N, Cohen-Melamed MH, Pinsky MR. Effect of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor therapy on leukocyte function and clearance of serious infection in nonneutropenic patients. *Chest.* 2005;127:2139-50.
- Rosendahl A, Checchin D, Fehniger TE, ten Dijke P, Heldin CH, Sideras P. Activation of the TGF-beta/activin-Smad2 pathway during allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;25:60-8.
- Rubin J, Rubin C, Jacobs CR. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene.* 2006;367:1-16.
- Ruiz PA, Jarai G. Discoidin domain receptors regulate the migration of primary human lung fibroblasts through collagen matrices. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012;5:3.
- Rygh P. Ultrastructural cellular reactions in pressure zones of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. *Acta Odontol Scand.* 1972;30:575-93.
- Rygh P, Reitan K. Ultrastructural changes in the periodontal ligament incident to orthodontic tooth movement. *Trans Eur Orthod Soc.* 1972:393-405.
- Rygh P, Selvig KA. Erythrocytic crystallization in rat molar periodontium incident to tooth movement. *Scand J Dent Res.* 1973;81:62-73.
- Rygh P. Elimination of hyalinized periodontal tissues associated with orthodontic tooth movement. *Scand J Dent Res.* 1974;82:57-73.
- Rygh P, Moyers RE. Force systems and tissue responses to force in orthodontics and facial orthopedics. In: Moyers RE editor. *Handbook of orthodontics.* 4th ed. Chicago. Yearbook Medical Publishers inc. 1988. p 306-31.
- Sadik CD, Luster AD. Lipid-cytokine-chemokine cascades orchestrate leukocyte recruitment in inflammation. *J Leukoc Biol.* 2012;91:207-15.
- Sagara H, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Ra C, Fukuda T, Nakao A. Activation of TGF-beta/Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110:249-54.
- Saito S, Ngan P, Rosol T, Saito M, Shimizu H, Shinjo N, Shanfeld J, Davidovitch Z. Involvement of PGE synthesis in the effect of intermittent pressure and interleukin-1 beta on bone resorption. *J Dent Res.* 1991;70:27-33.

- Saito S, Rosol TJ, Saito M, Ngan PW, Shanfeld J, Davidovitch Z. Bone-resorbing activity and prostaglandin E produced by human periodontal ligament cells in vitro. *J Bone Miner Res.* 1990;5:1013-8.
- Saito Y, Yoshizawa T, Takizawa F, Ikegame M, Ishibashi O, Okuda K, Hara K, Ishibashi K, Obinata M, Kawashima H. A cell line with characteristics of the periodontal ligament fibroblasts is negatively regulated for mineralization and Runx2/Cbfa1/Osf2 activity, part of which can be overcome by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Sci.* 2002;115:4191-200.
- Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9:447-53.
- Sanjai K, Kumarswamy J, Patil A, Papaiah L, Jayaram S, Krishnan L. Evaluation and comparison of decalcification agents on the human teeth. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;16:222-7.
- Sarelius IH, Kuebel JM, Wang J, Huxley VH. Macromolecule permeability of in situ and excised rodent skeletal muscle arterioles and venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290:H474-80.
- Sattari M, Fathiyeh A, Gholami F, Darbandi Tamijani H, Ghatreh Samani M. Effect of surgical flap on IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta$  concentrations in the gingival crevicular fluid of patients with moderate to severe chronic periodontitis. *Iran J Immunol.* 2011;8:20-6.
- Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:965-75.
- Scalia R. The microcirculation in adipose tissue inflammation. *Rev Endocr Metab Disor.* 2013;14:69-76.
- Schall TJ, Proudfoot AE. Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:355-63.
- Scharffetter K, Kulozik M, Stolz W, Lankat-Buttgereit B, Hatamochi A, Söhnchen R, Krieg T. Localization of collagen alpha 1(I) gene expression during wound healing by in situ hybridization. *J Invest Dermatol.* 1989;93:405-12.
- Schmelz M, Petersen LJ. Neurogenic inflammation in human and rodent skin. *News Physiol Sci.* 2001;16:33-7.
- Schmid-Schönbein GW. Analysis of inflammation. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006;8:93-131.
- Schmidt S, Friedl P. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell Tissue Res.* 2010;339:83-92.
- Schneider HG. Histological study on the age-related changes in the periodontal structure of rat molars. *Acta Anat (Basel).* 1968;70:26-40.
- Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med.* 2013;4:624-30.
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004;364:149-55.
- Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, Perretti M, Rossi AG, Wallace JL. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.* 2007;21:325-32.
- Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:349-61.
- Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 2005;6:1191-7.
- Shariat SF, Meneses-Diaz A, Kim IY, Muramoto M, Wheeler TM, Slawin KM. Tissue expression of transforming growth factor-beta 1 and its receptors: correlation with pathologic features and biochemical progression in patients undergoing radical prostatectomy. *Urology.* 2004;63:1191-7.
- Shen X, Zhu W, Zhang X, Xu G, Ju S. A role of both NF- $\kappa$ B pathways in expression and transcription regulation of BAFF-R gene in multiple myeloma cells. *Mol Cell Biochem.* 2011;357:21-30.
- Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003;113:685-700.
- Shimizu RT, Blank RS, Jervis R, Lawrenz-Smith SC, Owens GK. The smooth muscle alpha-actin gene promoter is differentially regulated in smooth muscle versus non-smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1995;270:7631-43.
- Shin HY, Simon SI, Schmid-Schönbein. Fluid shear-induced activation and cleavage of CD18 during pseudopod retraction by human neutrophils. *J Cell Physiol.* 2008;214:528-36.

- Shimura Y, Tsuchiya S, Hata K, Honda MJ. Quiescent epithelial cell rests of Malassez can differentiate into ameloblast-like cells. *J Cell Physiol.* 2008;217:728-38.
- Shinto O, Yashiro M, Toyokawa T, Nishii T, Kaizaki R, Matsuzaki T, Noda S, Kubo N, Tanaka H, Doi Y, Ohira M, Muguruma K, Sawada T, Hirakawa K. Phosphorylated smad2 in advanced stage gastric carcinoma. *BMC Cancer.* 2010;10:652.
- Shum DT, McFarlane RM. Histogenesis of Dupuytren's disease: an immunohistochemical study of 30 cases. *J Hand Surg Am.* 1988;13:61-7.
- Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol.* 2008;18:349-55.
- Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:807-21.
- Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res.* 2007;86:306-19.
- Silva TA, Lara VS, Silva JS, Garlet GP, Butler WT, Cunha FQ. Dentin sialoprotein and phosphoprotein induce neutrophil recruitment: a mechanism dependent on IL-1beta, TNF-beta, and CXC chemokines. *Calcif Tissue Int.* 2004;74:532-41.
- Silverio-Ruiz KG, Martinez AE, Garlet GP, Barbosa CF, Silva JS, Cicarelli RM, Valentini SR, Abi-Rached RS, Junior CR. Opposite effects of bFGF and TGF-beta on collagen metabolism by human periodontal ligament fibroblasts. *Cytokine.* 2007;39:130-7.
- Simon SI, Cherapanov V, Nadra I, Waddell TK, Seo SM, Wang Q, Doerschuk CM, Downey GP. Signaling functions of L-selectin in neutrophils: alterations in the cytoskeleton and colocalization with CD18. *J Immunol.* 1999;163:2891-901.
- Sismanidou C, Hilliges M, Lindskog S. Healing of the root surface-associated periodontium: an immunohistochemical study of orthodontic root resorption in man. *Eur J Orthod.* 1996;18:435-44.
- Skinninger BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2002;99:4283-97.
- Sloan AJ, Smith AJ. Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in vitro. *Arch Oral Biol.* 1999;44:149-56.
- Smith AJ. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ.* 2003;67:678-89.
- Smith CW. Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. *Can J Physiol Pharmacol.* 1993a;71:76-87.
- Smith CW. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Semin Hematol.* 1993b;30(4 Suppl 4):45-53; discussion 54-5.
- Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol.* 1997;151:317-22.
- Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 2009;86:1065-73.
- Song B, Estrada KD, Lyons KM. Smad signaling in skeletal development and regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20:379-88.
- Souza KL, Gurgul-Convey E, Elsner M, Lenzen S. Interaction between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in insulin-producing cells. *J Endocrinol.* 2008;197:139-50.
- Sowa H, Kaji H, Yamaguchi T, Sugimoto T, Chihara K. Smad3 promotes alkaline phosphatase activity and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res.* 2002;17:1190-9.
- Spearman M, Taylor WR, Greenberg AH, Wright JA. Antisense oligodeoxyribonucleotide inhibition of TGF-beta 1 gene expression and alterations in the growth and malignant properties of mouse fibrosarcoma cells. *Gene.* 1994;149:25-9.
- Sperandio M, Smith ML, Forlow SB, Olson TS, Xia L, McEver RP, Ley K. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J Exp Med.* 2003;197:1355-63.
- Sperandio M, Thatte A, Foy D, Ellices LG, Marth JD, Ley K. Severe impairment of leukocyte rolling in venules of core 2 glucosaminyltransferase-deficient mice. *Blood.* 2001;97:3812-9.
- Sporn MB, Roberts AB. A major advance in the use of growth factors to enhance wound healing. *J Clin Invest.* 1993;92:2565-6.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994;76:301-314.
- Stahl SS, Tonna EA, Weiss R. The effects of aging on the proliferative activity of rat periodontal structures. *J Gerontol.* 1969;24:447-50.

- Stahl SS, Tonna EA. H3-proline study of aging periodontal ligament matrix formation: comparison between matrices adjacent to either cemental or bone surfaces. *J Periodontol Res.* 1977;12:318-22.
- Stefanidakis M, Koivunen E. Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. *Blood.* 2006;108:1441-50.
- Subramani T, Rathnavelu V, Alitheen NB. The possible potential therapeutic targets for drug induced gingival overgrowth. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:639468.
- Sundd P, Pospieszalska MK, Ley K. Neutrophil rolling at high shear: Flattening, catch bond behavior, tethers and slings. *Mol Immunol.* 2013;55:59-69.
- Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 1994;55:410-22.
- Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol.* 2007;8:215.
- Takagawa S, Lakos G, Mori Y, Yamamoto T, Nishioka K, Varga J. Sustained activation of fibroblast transforming growth factor-beta/Smad signaling in a murine model of scleroderma. *J Invest Dermatol.* 2003;121:41-50.
- Takimoto T, Wakabayashi Y, Sekiya T, Inoue N, Morita R, Ichiyama K, Takahashi R, Asakawa M, Muto G, Mori T, Hasegawa E, Saika S, Hara T, Nomura M, Yoshimura A. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *J Immunol.* 2010;185:842-55.
- Talley-Ronsholdt DJ, Lajiness E, Nagodawithana K. Transforming growth factor-beta inhibition of mineralization by neonatal rat osteoblasts in monolayer and collagen gel culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1995;31:274-82.
- Tanabe H, Takayama I, Nishiyama T, Shimazaki M, Kii I, Li M, Amizuka N, Katsube K, Kudo A. Periostin associates with Notch1 precursor to maintain Notch1 expression under a stress condition in mouse cells. *PLoS One.* 2010;5:e12234.
- Tanamoto K, Shade U, Rietschel ET, Kusumoto S, Shiba T. Endotoxic induction of prostaglandin release from macrophages by nontoxic lipid A analogs synthesized chemically. *Infect Immun.* 1990;58:217-21.
- Tanne K, Shibaguchi T, Terada Y, Kato J, Sakuda M. Stress levels in the PDL and biological tooth movement. In: Davidovitch Z editor. *Biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation.* Ohio: The Ohio State University, College of Dentistry, 1992. p. 201-9.
- Tatakis DN, Wikesjö UM, Razi SS, Sigurdsson TJ, Lee MB, Nguyen T, Ongpipattanakul B, Hardwick R. Periodontal repair in dogs: effect of transforming growth factor-beta 1 on alveolar bone and cementum regeneration. *J Clin Periodontol.* 2000;27:698-704.
- Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:901-44.
- Teixeira CC, Khoo E, Tran J, Chartres I, Liu Y, Thant LM, Khabensky I, Gart LP, Cisneros G, Alikhani M. Cytokine expression and accelerated tooth movement. *J Dent Res.* 2010;89:1135-41.
- Ten Cate AR, Deporter DA, Freeman E. The role of fibroblasts in the remodeling of periodontal ligament during physiologic tooth movement. *Am J Orthod.* 1976;69:155-68.
- Ten Cate AR, Nanci A. Structure of the oral tissues. In: Nanci A editor. *Ten Cate's oral histology: development, structure and function.* 6th ed. Mosby, Inc. 2003. p. 1-16.
- ten Dijke P, Arthur HM. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:857-69.
- Terranova VP, Wikesjö UM. Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. A review. *J Periodontol.* 1987;58:371-80.
- Thakur A, Xue M, Stapleton F, Lloyd AR, Wakefield D, Willcox MD. Balance of pro- and anti-inflammatory cytokines correlates with outcome of acute experimental *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Infect Immun.* 2002;70:2187-97.
- Thilander B, Rygh P, Reitan K. Tissue reactions in orthodontics. In: Graber TM, Vanarsdall Jr RL editors. *Orthodontics - Current principles and techniques.* 3rd ed. Mosby. St Louis. 2000. p 117-188.
- Thompson K, Hamilton DW, Leask A. ALK5 inhibition blocks TGFβ-induced CCN2 expression in gingival fibroblasts. *J Dent Res.* 2010;89:1450-4.

- Thompson TJ, Owens PD, Wilson DJ. Intramembranous osteogenesis and angiogenesis in the chick embryo. *J Anat.* 1989;166:55-65.
- Thorne RF, Legg JW, Isacke CM. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J Cell Sci.* 2004;117:373-80.
- Tjäderhane L, Hotakainen T, Kinnunen S, Ahonen M, Salo T. The effect of chemical inhibition of matrix metalloproteinases on the size of experimentally induced apical periodontitis. *Int Endod J.* 2007;40:282-9.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:349-63.
- Tomokiyo A, Maeda H, Fujii S, Wada N, Shima K, Akamine A. Development of a multipotent clonal human periodontal ligament cell line. *Differentiation.* 2008;76:337-47.
- Tonna EA. The histochemical nature and possible significance of the subperiosteal reversal lines of aging rat femora. *J Gerontol.* 1959;14:425-9.
- Tsuchiya S, Tsuchiya M, Nishioka T, Suzuki O, Sasano Y, Igarashi K. Physiological distal drift in rat molars contributes to acellular cementum formation. *J Cell Physiol.* 2014;229:1647-59.
- Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell.* 1998;95:779-91.
- Turner NC. The response to injury. In: McGee J O'D, Isaacson PG, Wright NA editors. *Oxford textbook of pathology.* Oxford: Oxford University press, 1992. p. 351-412.
- Tyler LW, Matossian K, Todd R, Gallagher GT, White RR, Wong DT. Eosinophil-derived transforming growth factors (TGF-alpha and TGF-beta 1) in human periradicular lesions. *J Endod.* 1999;25:619-24.
- Uematsu S, Mogi M, Deguchi T. Interleukin (IL)-1b, IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$ , epidermal growth factor, and b2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 1996a; 75:562-7.
- Uematsu S, Mogi M, Deguchi T. Increase of transforming growth factor- $\beta$ 1 in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Archs Oral Biol.* 1996b;41:1091-5.
- Vaday GG, Lider O. Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2000;67:149-59.
- van Eeden SF, Lawrence E, Sato Y, Kitagawa Y, Hogg JC. Neutrophils released from the bone marrow by granulocyte colony-stimulating factor sequester in lung microvessels but are slow to migrate. *Eur Respir J.* 2000;15:1079-86.
- van Mourik JA, Romani de Wit T, Voorberg J. Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochem Cell Biol.* 2002;117:113-22.
- Van Schepdael A, Vander Sloten J, Geris L. A mechanobiological model of orthodontic tooth movement. *Biomech Model Mechanobiol.* 2013;12:249-65.
- Vandevska-Radunovic V, Kvinnsland IH, Kvinnsland S, Jonsson R. Immunocompetent cells in rat periodontal ligament and their recruitment incident to experimental orthodontic tooth movement. *Eur J Oral Sci.* 1997;105:36-44.
- Vandevska-Radunovic V. Neural modulation of inflammatory reactions in dental tissues incident to orthodontic tooth movement. A review of the literature. *Eur J Orthod.* 1999;21:231-47.
- Verna C, Zaffe D, Siciliani G. Histomorphometric study of bone reactions during orthodontic tooth movement in rats. *Bone.* 1999;24:371-9.
- Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A. Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem.* 2001;276:17058-62.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008;9:503-10.
- Vogt CJ, Schmid-Schönbein GW. Microvascular endothelial cell death and rarefaction in the glucocorticoid-induced hypertensive rat. *Microcirculation.* 2001;8:129-39.
- von Böhl M, Kuijpers-Jagtman AM. Hyalinization during orthodontic tooth movement: a systematic review on tissue reactions. *Eur J Orthod.* 2009;31:30-6.

- von Gersdorff G, Suszta K, Rezvani F, Bitzer M, Liang D, Böttinger EP. Smad3 and Smad4 mediate transcriptional activation of the human Smad7 promoter by transforming growth factor beta. *J Biol Chem.* 2000;275:11320-6.
- Vonk AG, Netea MG, Denecker NE, Verschueren IC, van der Meer JW, Kullberg BJ. Modulation of the pro- and anti-inflammatory cytokine balance by amphotericin B. *J Antimicrob Chemother.* 1998;42:469-74.
- Wahl SM. Glucocorticoids and wound healing. In: Schleimer RP, Claman HN, Oronsky AL editors. *Antiinflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects.* New York: Academic Press, 1989. p. 280-302.
- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:5788-92.
- Waldo CM, Rothblatt JM. Histologic response to tooth movement in the laboratory rat; procedure and preliminary observations. *J Dent Res.* 1954;33:481-6.
- Walker DC, Behzad AR, Chu F. Neutrophil migration through preexisting holes in the basal laminae of alveolar capillaries and epithelium during streptococcal pneumonia. *Microvasc Res.* 1995;50:397-416
- Waldrup WR, Bikoff EK, Hoodless PA, Wrana JL, Robertson EJ. Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell.* 1998;92:797-808.
- Walker JB, Buring SM. NSAID impairment of orthodontic tooth movement. *Ann Pharmacother.* 2001;35:113-5.
- Walter P. As células no seu contexto social - Patogénos, Infecção e imunidade inata. In: Alberts B, Alexander J, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P editors. *Biologia molecular da célula.* Reimpressão da 4ª ed. São Paulo: Artmed, 2007. p. 1424-63.
- Wang JH, Thampatty BP. An introductory review of cell mechanobiology. *Biomech Model Mechanobiol.* 2006;5:1-16.
- Wang L, Han G, Wang R, Chen G, Xu R, Xiao H, Li X, Geng S, Li Y, Li X, Wang J, Feng J, Riedemann NC, Guo R, Shen B, Li Y. Regulation of IL-8 production by complement-activated product, C5a, in vitro and in vivo during sepsis. *Clin Immunol.* 2010;137:157-65.
- Wang L, Zhu H, Liang T. The changes of transforming growth factor beta I in periodontal tissue during orthodontic tooth movement. *Chin J Dent Res.* 2000;3:19-22.
- Wei HB, Han XY, Fan W, Chen GH, Wang JF. Effect of retinoic acid on cell proliferation kinetics and retinoic acid receptor expression of colorectal mucosa. *World J Gastroenterol.* 2003;9:1725-8.
- Weinstein M, Yang X, Li C, Xu X, Gotay J, Deng CX. Failure of egg cylinder elongation and mesoderm induction in mouse embryos lacking the tumor suppressor smad2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:9378-83.
- Weivoda MM, Ruan M, Pederson L, Hachfeld C, Davey RA, Zajac JD, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Osteoclast TGF- $\beta$  Receptor Signaling Induces Wnt1 Secretion and Couples Bone Resorption to Bone Formation. *J Bone Miner Res.* 2015 Jun 24. doi: 10.1002/jbmr.2586. [Epub ahead of print].
- Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003;83:835-70.
- Werr J, Xie X, Hedqvist P, Ruoslahti E, Lindbom L. Beta1 integrins are critically involved in neutrophil locomotion in extravascular tissue In vivo. *J Exp Med.* 1998;187:2091-6.
- Werr J, Johansson J, Eriksson EE, Hedqvist P, Ruoslahti E, Lindbom L. Integrin  $\alpha$ 2b1 (VLA-2) is a principal receptor used by neutrophils for locomotion in extravascular tissue. *Blood.* 2000;95:1804-9.
- Wikesjö UM, Razi SS, Sigurdsson TJ, Tatakis DN, Lee MB, Ongpipattanakul B, Nguyen T, Hardwick R. Periodontal repair in dogs: effect of recombinant human transforming growth factor-beta I on guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 1998;25:475-81.
- Wilcko WM, Wilcko T, Bouquot JE, Ferguson DJ. Rapid orthodontics with alveolar reshaping: two case reports of decrowding. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2001;21:9-19.
- Wild T, Rahbarnia A, Kellner M, Sobotka L, Eberlein T. Basics in nutrition and wound healing. *Nutrition.* 2010;26:862-6.
- Winyard PG. Key stages in the acute inflammatory response and their relevance as therapeutic targets. In: Winyard PG and Willoughby DA editors. *Inflammation protocols – Methods in Molecular Biology* 225. Totowa: Humana press, 2003. p. 4-17.
- Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ, Hinz B. Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta I from the extracellular matrix. *J Cell Biol.* 2007;179:1311-23.

- Wise GE, King GJ. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2008;87:414-34.
- Wiseman DM, Poverini PJ, Kamp DW, Leibovich SJ. Transforming growth factor-beta (TGF beta) is chemotactic for human monocytes and induces their expression of angiogenic activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;157:793-800.
- Wong C, Rougier-Chapman EM, Frederick JP, Datto MB, Liberati NT, Li JM, Wang XF. Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol.* 1999;19:1821-30.
- Wong SY. Innate immune trouble detectors. *Trends Immunol.* 2001;22:235-6.
- Woolhouse IS, Bayley DL, Lalor P, Adams DH, Stockley RA. Endothelial interactions of neutrophils under flow in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2005;25:612-7.
- Wu S, Kasisomayajula K, Peng J, Bancalari E. Inhibition of JNK enhances TGF-beta1-activated Smad2 signaling in mouse embryonic lung. *Pediatr Res.* 2009;65:381-6.
- Wu Y, Li Q, Zhou X, Yu J, Mu Y, Munker S, Xu C, Shen Z, Müllenbach R, Liu Y, Li L, Gretz N, Zieker D, Li J, Matsuzaki K, Li Y, Dooley S, Weng H. Decreased levels of active SMAD2 correlate with poor prognosis in gastric cancer. *PLoS One.* 2012;7:e35684.
- Xiong J, Mrozik K, Gronthos S, Bartold PM. Epithelial cell rests of Malassez contain unique stem cell populations capable of undergoing epithelial-mesenchymal transition. *Stem Cells Dev.* 2012;21:2012-25.
- Yamaguchi M, Aihara N, Kojima T, Kasai K. RANKL increase in compressed periodontal ligament cells from root resorption. *J Dent Res.* 2006;85:751-6.
- Yamasaki K, Shibata Y, Fukuhara T. The effect of prostaglandins on experimental tooth movement in monkeys (*Macaca fuscata*). *J Dent Res.* 1982;61:1444-6.
- Yamashita H, ten Dijke P, Franzén P, Miyazono K, Heldin CH. Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 1994;269:20172-8.
- Yan X, Liu Z, Chen Y. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2009;41:263-72.
- Yang J, Tyler LW, Donoff RB, Song B, Torio AJ, Gallagher GT, Tsuji T, Elovic A, McBride J, Yung CM, Galli SJ, Weller PF, Wong DT. Salivary EGF regulates eosinophil-derived TGF-alpha expression in hamster oral wounds. *Am J Physiol.* 1996;270:G191-202.
- Yang EY, Moses HL. Transforming growth factor beta 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J Cell Biol.* 1990;111:731-41.
- Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, Chen L, Hayman R, Gu H, Roberts AB, Deng C. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta. *EMBO J.* 1999;18:1280-91.
- Yang YC, Piek E, Zavadil J, Liang D, Xie D, Heyer J, Pavlidis P, Kucherlapati R, Roberts AB, Böttinger EP. Hierarchical model of gene regulation by transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:10269-74.
- Yasui T, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Matsumoto T, Masuda H, Hirose J, Omata Y, Yasuda H, Imamura T, Nakamura K, Tanaka S. Regulation of RANKL-induced osteoclastogenesis by TGF-beta through molecular interaction between Smad3 and Traf6. *J Bone Miner Res.* 2011;26:1447-56.
- Zaki AE, Vanhuysen G. Histology of the periodontium following tooth movement. *J Dent Res.* 1963;42:1373-9.
- Zakrzewicz A, Gräfe M, Terbeek D, Bongrazio M, Auch-Schwelk W, Walzog B, Graf K, Fleck E, Ley K, Gaetgens P. L-selectin-dependent leukocyte adhesion to microvascular but not to macrovascular endothelial cells of the human coronary system. *Blood.* 1997;89:3228-35.
- Zarbock A, Ley K. Mechanisms and Consequences of Neutrophil Interaction with the Endothelium. *Am J Pathol.* 2008;172:1-7.
- Zarbock A, Ley K. Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation.* 2009;16:31-42.
- Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev.* 2007;21:99-111.
- Zainal Ariffin SH, Yamamoto Z, Zainol Abidin IZ, Megat Abdul Wahab R, Zainal Ariffin Z. Cellular and molecular changes in orthodontic tooth movement. *ScientificWorldJournal.* 2011;11:1788-803.
- Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 2007;67:10123-8.

- Zelzer E, McLean W, Ng YS, Fukai N, Reginato AM, Lovejoy S, D'Amore PA, Olsen BR. Skeletal defects in VEGF (120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development*. 2002;129:1893-904.
- Zhao M, Xiao G, Berry JE, Franceschi RT, Reddi A, Somerman MJ. Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res*. 2002;17:1441-51.
- Zhelev DV, Alteraifi AM, Chodniewicz D. Controlled pseudopod extension of human neutrophils stimulated with different chemoattractants. *Biophys J*. 2004;87:688-95.
- Zhou D, Hughes B, King GJ. Histomorphometric and biochemical study of osteoclasts at orthodontic compression sites in the rat during indomethacin inhibition. *Arch Oral Biol*. 1997;42:717-26.
- Zhuang H, Wang W, Tahernia AD, Levitz CL, Luchetti WT, Brighton CT. Mechanical strain-induced proliferation of osteoblastic cells parallels increased TGF-beta 1 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;229:449-53.
- Zilberberg J, Harris NR. Role of shear and leukocyte adherence on venular permeability in the rat mesentery. *Microvasc Res*. 2001a;62:215-25.
- Zilberberg J, Harris NR. Synergism between leukocyte adherence and shear determines venular permeability in the presence of nitric oxide. *Microvasc Res*. 2001b;62:410-20.
- Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell*. 2010;140:798-804.



## **Capítulo VI. Anexos**

---



### Listagem de Acrónimos

5-TH - 5-hidroxitriptamina

ALP - *Alkaline phosphatase* / Fosfatase alcalina

AMH - *Anti-müllerian hormone* / Hormona anti-mülleriana

AMPc - *Cyclic adenosine monophosphate* / Adenosina monofosfato cíclica

BAFF/BLyS - *B-cell activating factor, B-lymphocyte stimulator* / Fator ativador de linfócitos B

BAFF-R - *BAFF receptor; BLyS receptor 3* / Recetor para o BAFF

BCMA - *B-cell maturation antigen* / Antígeno da maturação das células B

bFGF - *Basic fibroblast growth factor* / Fator de crescimento de fibroblasto básico

BMP - *Bone morphogenetic protein* / Proteína morfogenética do osso

CCNs - Células das cristas neurais

CD44 - Recetor hialuronato

CD62E/ELAM-1 – Selectina-E

CD62L – Selectina-L

CD62P – Selectina-P

CDK - *Cyclin-dependent kinase* / Cinases ciclino-dependentes

CGRP - *Calcitonin gene-related peptide* / Peptídeo relacionado com o gene da calcitonina

Co-Smad - *Common-partner Smad* / Smad mediadora comum

CTGF - *Connective tissue growth factor* / Fator de crescimento do tecido conjuntivo

DAMP - *Damage-associated molecular pattern* / Padrão molecular lesão-associado

DDR - *Discoidin domain receptor* / Recetor com domínio discoidina

DHA - Ácido docosahexanóico

EDTA - Ácido etileno-diamino-tetracético

EGF - *Epidermal growth factor* / Fator de crescimento epidermal

Egr-1 - *Early growth response protein 1/Zif268; Zinc finger protein 225/NGFI-A; Nerve growth factor-induced protein A*

ELF - *Embryonic liver fodrin* / Fodrina do fígado embrionário  
EMT - *Epithelial-mesenchymal transition* / Transição epitelial-mesenquimal  
EndMT - *Endothelial-mesenchymal transition* / Transição endotelial-mesenquimal  
EPA - Ácido eicosapentanóico  
fMLP - N-Formil-metionil-leucil-fenilalanina  
GADD34 - *Growth arrest and DNA damage protein* / Proteína paragem do crescimento e lesão do ADN  
G-CSF - *Granulocyte colony-stimulating factor* / Fator de estimulação de colónia de granulócitos  
GDF - *Growth differentiation factor* / Fator de crescimento da diferenciação  
GM-CSF - *Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor* / Fator de estimulação de colónia de granulócitos-  
-monócitos  
GP - Glicoproteína  
GPIIb/IIIa - Integrina  $\alpha 2\beta 3$   
GPVI - Glicoproteína da membrana VI  
GPCR - *G protein-coupled receptor* / Recetor acoplado à proteína G; recetor G-acoplado  
GMPc - *Cyclic guanosine monophosphate* / Guanosina monofosfato cíclica  
HE - Hematoxilina-Eosina  
HEV - *High endothelial venule* / Vénula endotelial alta  
HOCl - Ácido hipocloroso  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogénio  
ICAM – *Intercellular adhesion molecule* / Molécula de adesão intercelular  
Ig - Imunoglobulina  
IHC - *Immunohistochemistry* / Imunohistoquímica  
IL – Interleucina (1, 6, 8)  
IL-1ra - *IL-1 receptor antagonist* / Recetor antagonista da IL-1  
IFN- $\gamma$  - Interferão-gama  
I-Smad - *Inhibitory Smad* / Smad inibidora  
JNK - *c-Jun N-terminal kinase* / Cinase c-Jun N-terminal  
LAP - *Latency-associated peptide* / Peptídeo associado à latência  
LLC - *Large latent complex* / Complexo TGF- $\beta$  latente grande  
LFA-1 - CD11a/CD18;  $\alpha\beta 2$  / *Leukocyte function antigen-1; Lymphocyte function-associated antigen-1*  
LSAB - *Labeled streptavidin biotin method* / Método estreptoavidina-biotina peroxidase  
LPS - Lipopolissacarídeo  
LTBP - *Latent TGF- $\beta$  binding protein* / Proteína de ligação do TGF- $\beta$  latente L-TGF- $\beta$  - *Latent TGF- $\beta$*  / TGF- $\beta$  latente  
Mac-1 - *Macrophage-1 antigen, Membrane-activated complex-1* / CD11b/CD18,  $\alpha M\beta 2$ , recetor do complemento 3  
M1 - 1º molar maxilar  
M2 - 2º molar maxilar  
M3 - 3º molar maxilar  
MAPK - Via da proteína-cinase ativada por mitogénese

MCP-1 - *Monocyte chemoattractant protein-1* / Proteína quimioatratante dos monócitos-1  
M-CSF - *Macrophage colony-stimulating factor* / Fator estimulador de colônia de macrófagos  
MET - *Mesenchymal-epithelial transition* / Transição mesenquimal-epitelial  
MH1 - *Mad-homology 1*  
MH2 - *Mad-homology 2*  
MMP1 - Colagenase I  
MMP2 - Gelatinase A  
MMP8 - Colagenase 2  
MMP9 - Gelatinase B  
mARN - Ácido ribonucleico mensageiro  
NADPH oxidase - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase  
NF- $\kappa$ B - *Nuclear factor kappa B* / Fator nuclear kappa B  
NK - *Natural Killer cell* / Célula exterminadora natural  
NES - *Nuclear export signal* / Sinal de exportação nuclear  
NLS - *Nuclear localization signal* / Sinal de localização nuclear  
NLR - *NOD-like receptor* / Recetor NOD-like  
NO - Óxido nítrico  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Anião superóxido  
OPG - Osteoprotegerina  
PAF - *Platelet-activating factor* / Fator ativador de plaquetas  
PAI-1 - *Plasminogen activator inhibitor-1* / Inibidor do ativador do plasminogéneo-1  
PAMP - *Pathogen-associated molecular pattern* / Padrão molecular patógeno-associado  
PBS - *Phosphate buffered saline* / Tampão fosfato-salino  
PCNA - *Proliferating cell nuclear antigen* / Antígeno nuclear de proliferação celular  
PDGF - *Platelet-derived growth factor* / Fator de crescimento derivado de plaquetas  
PG - Prostaglandina (A, D, E<sub>2</sub>, F $\alpha$ )  
PI3Ks - *Phosphoinositide 3-kinase* / Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinase/Akt  
PMN - Polimorfonuclear  
PPI - *Protein phosphatase 1* / Proteína fosfatase I  
PRR - *Pattern recognition receptor* / Recetor reconhecedor de padrões  
PSGL-1 - *P-selectin glycoprotein ligand-1* / Glicoproteína ligando-1 da selectina-P  
RANK - *Receptor activator of NF- $\kappa$ B* / Recetor ativador do NF- $\kappa$ B  
RANKL - *Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand* / Ligando do recetor ativador do NF- $\kappa$ B  
Rho GTPases - *Rho guanosine triphosphatases* / Rho guanosina trifosfatases  
rhTGF- $\beta$ 1 - TGF- $\beta$  recombinante humano  
RLR - *RIG-like receptor* / Recetor RIG-I-like  
ROS - *Reactive oxygen species* / Espécies de oxigénio reativo  
R-Smad - *Receptor-activated Smad* / Smad recetor-regulada

SARA - *Smad anchor for receptor activation*

SBE - *Smad-binding element* / Elemento de ligação à Smad

Smurf - *Smad ubiquitination regulatory factor* / Fator regulador de ubiquitinação das Smads

SP - *Substance P* / Substância P

SSRE - *Shear stress response elements* / Elementos de resposta à tensão tangencial

T $\beta$  RI / ALK5 - *Activin-linked kinase 5* / Recetor tipo I do fator de crescimento transformante- $\beta$

T $\beta$  RII - Recetor tipo II do fator de crescimento transformante- $\beta$

TA - Ativador do TGF- $\beta$

TAC1 - *Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor* / Ativador transmembranar modelador de cálcio e interator de ligando da ciclofilina

TF - *Transcription factor* / Fator de transcrição

TGF- $\beta$  - *Transforming growth factor- $\beta$*  / Fator de crescimento transformante- $\beta$

Th2 - *T helper 2* / Linfócito T auxiliar 2

TIMP - *Tissue inhibitor of metalloproteinases* / Inibidor tecidual das MMPs

TMA - *Tissue microarray*

TNF- $\alpha$  - *Tumor necrosis factor- $\alpha$*  / Fator de necrose tumoral- $\alpha$

TRAP-1 - *TGF- $\beta$  receptor-associated protein-1* / Proteína I associada ao recetor do TGF- $\beta$

uPA - *Urokinase plasminogen activator* / Urocinase ativadora do plasminogénio

VCAM-1 - *Vascular cell adhesion molecule* / Molécula de adesão celular vascular I

VE-Caderina - Caderina vascular endotelial

VEGF - *Vascular endothelial growth factor* / Fator de crescimento vascular endotelial

VIP - *Vasoactive intestinal peptide* / Peptídeo intestinal vasoativo

VLA-2 - Integrina  $\alpha$ 2 $\beta$ 1

VnR -  $\alpha$ V $\beta$ 3; recetor da vitronectina

vWF - *von Willebrand factor* / Fator de von Willebrand

$\alpha$ Sma - Actina do músculo liso alfa / *Alpha-smooth muscle Actin*

## Listagem de Figuras

Figura 1.1 – Ativação e sinalização do TGF- $\beta$ através da via de sinalização canônica das Smads. O TGF- $\beta$ é secretado como constituinte do complexo latente grande (LCC, <i>Large latente complex</i> ) que após ativação por proteólise enzimática, o liberta. O TGF- $\beta$ interage com o T $\beta$ RII que posteriormente fosforila e ativa o T $\beta$ RI. O T $\beta$ RIII promove a interação e afinidade do TGF- $\beta$ com o T $\beta$ RII. O T $\beta$ RI, por sua vez, vai ativar os transdutores de sinal Smad2 e Smad3, que formam um complexo com a Smad4 e translocam para o núcleo onde modelam a transcrição dos genes alvo. A sinalização é inibida pela Smad7 que pode bloquear a fosforilação da Smad2 ou da Smad3, competindo com elas pela ligação ao T $\beta$ RI. A Smad7 pode levar a desfosforilação do T $\beta$ RI ao interagir com a proteína paragem do crescimento e lesão do ADN (GADD34, <i>growth arrest and DNA damage protein</i> ) que recruta a proteína fosfatase 1 (PP1, <i>protein phosphatase 1</i> ). A Smad7 recruta a Smurf que degrada o T $\beta$ RI. ....	38
Figura 1.2 – O TGF- $\beta$ liga-se ao T $\beta$ RII que ativa o T $\beta$ RI. Este por sua vez, fosforila as R-Smads, libertando-as do citoplasma e permitindo a sua translocação para o núcleo sob a forma de complexos com a Smad4. No núcleo a interação das Smads com os cofatores, coativadores e correpressores determinará quais os genes que serão reconhecidos pelos complexos .....	39
Figura 2.1 – Cronograma do estudo experimental em rato <i>Wistar</i> .....	54
Figura 2.2 – Desenho ilustrando a distribuição da força atuante sobre o 1° (M1), 2° (M2) e 3° molar (M3) maxilares após a colocação do elastômero .....	55
Figura 2.3 – (A) Os três molares maxilares (M1, M2 e M3), sendo visível as suas diferentes dimensões, bem como a disposição radicular. (B) Face oclusal dos dentes do 1° quadrante, mostrando as dimensões coronárias relativas e as respetivas superfícies de contato .....	55
Figura 2.4 – Fragmento hemi-maxilar direito antes da inclusão, sendo visíveis os três molares e parte do palato.....	56
Figura 2.5 – Tecido descalcificado, incluído em parafina, mostrando os dentes (M1 e M2) e o elástico (seta).....	57
Figura 2.6 – Lâmina histológica não corada, mostrando o local que tinha sido ocupado pelo elástico (seta) e pelos 1° e 2° molares (M1 e M2).....	57
Figura 2.7 – Lâmina histológica corada com HE, mostrando o local que tinha sido ocupado pelo elástico (seta) e o 1° e 2° molares maxilares.....	57
Figura 2.8 – Aspeto histológico do ligamento periodontal, no qual é visível um grande número de células fusiformes distribuídas uniformemente .....	60
Figura 2.9 – Aspeto histológico da polpa dentária, na qual se observam os odontoblastos no seu arranjo regular e organizado, sendo também visíveis vasos sanguíneos pulpaes.....	61

Figura 2.10 – Aspeto histológico do ligamento periodontal e da superfície radicular, no qual se observam fibroblastos ligamentares (seta branca) e cementoblastos (seta preta), estes últimos adjacentes à superfície radicular .....	62
Figura 2.11 – Corte histológico onde é visível um cone de reabsorção óssea na parede alveolar distal sujeita à força de pressão durante o movimento dentário fisiológico. Observam-se osteoblastos (*) alinhados quer ao longo de toda a superfície alveolar quer no interior do cone de reabsorção .....	62
Figura 2.12 – Aspeto histológico das linhas de reversão, traduzindo o intenso processo de remodelação do tecido ósseo alveolar durante o movimento dentário .....	63
Figura 2.13 – Aspeto histológico da raiz mesial de M1, na qual está patente a morfologia conservada do periodonto e do septo ósseo inter-radicular. São visíveis fenômenos incipientes de reabsorção óssea (seta branca) no lado distal associados à migração fisiológica do dente. Em apical observa-se uma pequena lacuna de reabsorção radicular (seta preta) que poderá estar associada à função fisiológica da mastigação. A polpa dentária apresenta-se bem vascularizada.....	63
Figura 2.14 – Aspeto histológico da raiz distal de M1, onde são visíveis zonas de reabsorção óssea (seta) mais extensas no lado distal, associadas à compressão durante o movimento dentário fisiológico. Observa-se a distribuição dos vasos sanguíneos ao longo de todo o ligamento periodontal, encontrando-se estes mais hiperémicos junto à superfície distal em que a remodelação é mais intensa ...	63
Figura 2.15 – Maior ampliação de uma área representada na Figura 2.13 mostrando o lado distal de pressão da raiz mesial de M1, onde são notórios processos de remodelação óssea da parede alveolar (seta), bem como a orientação oblíqua das fibras de Colágeno.....	64
Figura 2.16 – Maior ampliação da Figura 2.14 correspondente ao lado mesial da raiz distal de M1, sujeito a forças de tensão durante a migração fisiológica, onde é visível a integridade quer da parede óssea alveolar quer da superfície radicular durante a migração fisiológica. São visíveis osteoblastos dispostos ao longo de toda a superfície alveolar (seta).....	64
Figura 2.17 – Maior ampliação da Figura 2.14 correspondente ao lado distal da raiz distal de M1, sujeito a forças de pressão durante a migração fisiológica, onde é visível reabsorção mais intensa da superfície alveolar, surgindo lacunas (seta preta) com osteoclastos (seta branca) no seu interior. Os vasos sanguíneos surgem aqui mais hiperémicos (*) .....	64
Figura 2.18 – Aspeto histológico do lado de pressão do movimento fisiológico, no qual se observam células com fenótipo de cementoblastos (seta) a expressarem o TGF- $\beta$ 1 .....	65
Figura 2.19 – Aspeto histológico do lado de tensão, evidenciando a ausência de expressão do TGF- $\beta$ 1 .....	65
Figura 2.20 – (A) Corte histológico do lado de pressão, sendo visível os fibroblastos, cementoblastos (seta branca) células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta preta) a expressarem Smad2. São visíveis também na superfície radicular lacunas de reabsorção. (B) Corte histológico semelhante, onde fibroblastos, cementoblastos (seta branca) e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta preta) a expressarem Smad2.....	66
Figura 2.21 – Aspeto histológico do septo inter-dentário entre M1 e M2 e respetivo ligamento periodontal, onde se observam fibroblastos, células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta preta), osteoblastos e osteócitos (seta branca) a expressarem Smad2 .....	66
Figura 2.22 – Corte histológico mostrando, no lado de tensão, fibroblastos e cementoblastos a expressarem Smad2...	67
Figura 2.23 – Corte histológico do ligamento periodontal, onde são visíveis fibroblastos a expressarem Smad2 .....	67
Figura 2.24 – Aspeto histológico do lado de tensão mesial de M1, evidenciando a ausência de expressão da Smad3 .....	68
Figura 2.25 – Imagem histológica do lado de pressão do movimento, sendo observados fibroblastos, células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta preta) e cementoblastos (seta branca) em processo ativo de síntese, a expressarem IL-10.....	68
Figura 2.26 – Corte histológico mostrando a expressão da IL-10 pelos fibroblastos e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta).....	69

Figura 2.27 – Aspeto histológico representativo do periodonto, no lado de pressão do movimento fisiológico, após marcação para o PCNA, não se observando imunorreação positiva nas células do ligamento periodontal ...	69
Figura 2.28 – Aspeto histológico da raiz mesial de M1, onde é possível observar a frente de reabsorção óssea (setas) no lado de compressão e a acentuada neoformação de cimento celular no lado de tensão.....	70
(D - dentina; OA - osso alveolar; LP - ligamento periodontal; P - polpa; CC - cimento celular).....	70
Figura 2.29 – Maior ampliação da imagem anterior pondo em evidência a existência dos cementoblastos (*) e a formação de cimento celular no lado sujeito a tensão .....	70
Figura 2.30 – Corte histológico de uma área sujeita a pressão em mesial da raiz mesial de M1, onde são visíveis fenômenos de reabsorção ativa quer na superfície radicular (seta preta) quer na parede óssea alveolar (seta laranja). De salientar a existência de pequenas zonas hemorrágicas (*) no ligamento periodontal, principalmente adjacentes às áreas de reabsorção radicular.....	71
Figura 2.31 – Aspeto histológico típico do periodonto na área de pressão da raiz mesial de M1. São visíveis processos de reabsorção óssea direta (seta) com a presença de osteoclastos (*). De notar a manutenção da integridade radicular e do ligamento periodontal. É visível também a maior espessura de cimento celular no lado distal .....	71
Figura 2.32 – Aspeto histológico da zona apical, onde se observa a formação de tecido ósseo <i>de novo</i> ao longo da parede óssea alveolar. De salientar a integridade da superfície radicular bem como a normal organização do ligamento periodontal. Junto à parede alveolar em remodelação são visíveis vasos sanguíneos (seta).....	72
Figura 2.33 – Corte histológico do lado mesial do periodonto da raiz mesial de M1, ilustrando a intensa remodelação do tecido ósseo alveolar, traduzido pelo grande número de linhas de reversão (seta preta) e pela presença de vasos sanguíneos. De registar a manutenção da integridade do ligamento periodontal e o aspeto em paliçada dos cementoblastos (seta branca) num processo ativo de formação de cimento acelular .....	72
Figura 2.34 – Imagem histológica do periodonto na zona de pressão, na qual são evidentes as lacunas de reabsorção do tecido ósseo (seta) e o aspeto hipercelular do ligamento periodontal.....	73
Figura 2.35 – Imagem histológica ilustrando a presença de linha de reversão (seta) na superfície alveolar sujeita a uma força, que devido à <i>versão</i> do dente deverá ser de pressão nesta região apical, traduzindo os processos de remodelação do tecido ósseo da parede óssea alveolar .....	73
Figura 2.36 – Aspeto histológico da raiz mesial da secção que evidencia a persistência às 24 horas de fenómenos associados à migração fisiológica. De referir a existência no tecido ósseo alveolar de cones de reabsorção óssea direta (*) no lado de tensão distal e a neoformação óssea no lado de pressão mesial, sendo notória a linha de reversão (seta preta), demonstrando a remodelação que aqui ocorreu. No terço apical da raiz observa-se a camada de cimento celular. É no entanto já notória a diminuição de espessura do ligamento periodontal em mesial (setas duplas).....	74
Figura 2.37 – Imagem histológica do septo inter-radicular evidenciando a existência de fenómenos de reabsorção/remodelação no lado de compressão da raiz distal de M1 (seta branca) e de neoformação óssea (seta preta) no lado oposto de tensão associado à raiz mesial.....	75
Figura 2.38 – Aspeto histológico da região apical da raiz mesial de M1, onde é visível a presença de lacunas de reabsorção (*) sobre a superfície radicular, atingindo já a dentina radicular .....	76
Figura 2.39 – Aspeto histológico da região inter-radicular pondo em evidência as diferenças na remodelação da crista óssea alveolar dependentes das forças que sobre ela atuam. No lado mesial de pressão da raiz distal são visíveis osteoclastos alojados nas suas lacunas (seta preta), ao longo de toda a parede óssea, promovendo a reabsorção do tecido ósseo alveolar. No lado de tensão da raiz mesial é perceptível a aposição de novo osso com a característica linha de reversão (seta branca). De registar uma pequena lacuna de reabsorção na superfície radicular (seta amarela) e o aspeto hiperémico dos vasos sanguíneos intrapulpare da raiz distal.....	76

Figura 2.40 – Corte histológico do lado de pressão mesial, sendo patente a expressão pelos fibroblastos e cementoblastos (seta) do TGF- $\beta$ 1.....	77
Figura 2.41 – Aspeto histológico do ligamento periodontal evidenciando a expressão do TGF- $\beta$ 1 pelos fibroblastos....	77
Figura 2.42 – Aspeto histológico do lado de pressão mesial, ilustrando a expressão intensa da Smad2 pelos fibroblastos	78
Figura 2.43 – Imagem histológica do lado de pressão, sendo patente a expressão da Smad2 pelos fibroblastos e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta). São também visíveis alguns osteócitos a expressarem Smad2 .....	78
Figura 2.44 – Aspeto histológico do lado de tensão distal, mostrando a expressão da Smad2 pelos fibroblastos e cementoblastos (seta), estes últimos mais intensamente .....	79
Figura 2.45 – Imagem histológica do lado de tensão ilustrando a expressão da Smad2 por fibroblastos, osteócitos (seta branca) e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta preta).....	79
Figura 2.46 – Imagem histológica ilustrando a ausência de expressão da Smad3 .....	80
Figura 2.47 – Aspeto histológico do lado de pressão mesial. São visíveis fibroblastos, células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta vermelha), osteoclastos (*) e alguns cementoblastos (seta preta) a expressarem IL-10.....	80
Figura 2.48 – (A) Aspeto histológico das estruturas do periodonto na zona de tensão, sendo patente a expressão da IL-10 pelos fibroblastos. x200 no original. (B) Maior ampliação de uma zona similar, onde é visível a expressão da citocina pelos fibroblastos, cementoblastos (seta branca) e osteócitos (seta preta) .....	81
Figura 2.49 – Maior ampliação de uma região representada na imagem anterior (A), demonstrando a expressão da IL-10 pelos cementoblastos (seta preta), cementócitos (seta branca) e fibroblastos (*) .....	81
Figura 2.50 – Imagem histológica do ligamento periodontal ilustrando a expressão da IL-10 pelos osteoblastos do osso alveolar propriamente dito (seta preta) e pelos fibroblastos no lado de tensão (*). De notar a nítida inserção das fibras de Sharpey no tecido ósseo (seta branca).....	82
Figura 2.51 – Aspeto histológico ilustrando a ausência de expressão da $\alpha$ -Sma no ligamento periodontal, sendo apenas visíveis células musculares lisas a expressarem a proteína.....	82
Figura 2.52 – Aspeto histológico do lado de pressão do movimento, sendo visível a expressão do PCNA nos fibroblastos (seta) do ligamento periodontal.....	83
Figura 2.53 – Imagem histológica da reação de IHC para o PCNA, revelando a expressão quer nos fibroblastos (seta preta) do ligamento periodontal quer nos cementoblastos-like (seta amarela), no lado de tensão do movimento .....	83
Figura 2.54 – Imagem histológica do lado de pressão, onde é visível um acentuado processo de reabsorção óssea direta com a presença de inúmeros osteoclastos (seta). No ligamento periodontal está patente uma hiper celularidade e, adjacente ao cimento acelular, são observadas pequenas zonas de hialinização .....	84
Figura 2.55 – Imagem histológica evidenciando a hiper celularidade presente no ligamento periodontal e uma área de hialinização adjacente ao cimento acelular.....	84
Figura 2.56 – Aspeto histológico do ligamento periodontal no lado de pressão onde se observa a existência de pequenos vasos hemorrágicos (seta) e um certo reforço de infiltrado inflamatório. São ainda visíveis algumas fibras de Sharpey e a diminuição de celularidade na zona de hialinização adjacente à raiz.....	85
Figura 2.57 – Corte histológico do ligamento periodontal na face mesial da raiz mesial de M1, na qual é visível uma extensa área de hialinização adjacente à superfície radicular, numa zona que de acordo com Waldo e Rothblatt (1954) será de pressão. É visível também uma extensa angiogénese (seta) adjacente à área hialinizada acompanhada de hiper celularidade na porção do ligamento não afetada pela hialinização....	85
Figura 2.58 – Aspeto histológico do periodonto no lado de tensão onde é notória a neoformação de cimento bem como a camada de cementoblastos suprajacente (seta). De notar a orientação das fibras do ligamento periodontal em sentido apical do osso alveolar para o cimento radicular.....	86

Figura 2.59 – Imagem histológica da região inter-radicular ilustrando a diminuição de espessura (setas duplas) do ligamento periodontal e a presença de osteoclastos (seta) no tecido ósseo alveolar, traduzindo a ocorrência de reabsorção óssea direta numa região que de acordo com Waldo e Rothblatt (1954) seria de tensão. No lado de tensão distal associado à raiz mesial de M1, salienta-se a ocorrência de uma ligeira hiper celularidade bem como a presença de pequenas áreas hemorrágicas (*) .....	87
Figura 2.60 – Imagem histológica ilustrando a presença de uma área de reabsorção dentinária não reparada e evidente hiper celularidade do ligamento periodontal no lado de tensão. De salientar ainda um certo reforço fibroso (*) do ligamento periodontal.....	87
Figura 2.61 – Aspecto histológico do periodonto no lado de tensão, sendo visível a espessa camada de cimento celular, bem como alguns cementócitos (seta branca), e a presença de uma linha nítida de demarcação entre o tecido ósseo alveolar e o tecido ósseo recém-formado (*). De notar a manutenção da integridade do ligamento periodontal e ainda da camada cementoblástica (seta preta) e osteoblástica (seta laranja) bem como das fibras de Sharpey.....	88
Figura 2.62 – Corte histológico do lado de pressão onde se observa, ao nível da parede óssea alveolar, a presença de uma superfície bastante irregular com típicas lacunas de Howship que caracterizam a ocorrência de processos ativos de reabsorção.....	88
Figura 2.63 – Aspecto histológico do lado de pressão, sendo visíveis fibroblastos e alguns cementoblastos (seta) a expressarem tenuamente TGF- $\beta$ 1.....	89
Figura 2.64 – Imagem histológica do lado de pressão, na qual são visíveis fibroblastos, células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (*) e cementoblastos (seta) a expressarem Smad2 .....	90
Figura 2.65 – Imagem histológica do periodonto da zona de tensão, na qual são visíveis fibroblastos, osteócitos (seta amarela) e cementoblastos (seta branca) a expressarem Smad2. De salientar a presença de células perivasculares células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta preta) também a expressarem com menos intensidade Smad2 .....	90
Figura 2.66 – Maior ampliação da imagem anterior mostrando os fibroblastos, cementoblastos (seta branca) e péricitos/células mesenquimatosas indiferenciadas (seta preta) a expressarem intensamente Smad2.....	91
Figura 2.67 – Imagem histológica do lado de pressão, na qual estão presentes fibroblastos a expressarem IL-10. Estão também presentes cementoblastos (seta) e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta) a expressarem mais intensamente a IL-10. x400 no original.....	91
Figura 2.68 – Imagem histológica do lado de tensão, na qual estão presentes fibroblastos, cementoblastos (seta preta) e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta branca) a expressarem IL-10 ....	92
Figura 2.69 – Imagem histológica do ligamento periodontal, na qual são visíveis fibroblastos com uma expressão mais moderada da IL-10 .....	92
Figura 2.70 – Aspecto histológico do periodonto do lado de pressão, sendo visível a expressão do PCNA.....	93
Figura 2.71 – Maior ampliação da imagem anterior na qual é visível a expressão nas células do ligamento periodontal do PCNA .....	93
Figura 2.72 – Imagem histológica representativa do periodonto do lado de tensão na qual são visíveis células a expressarem PCNA, nomeadamente cementoblastos-like (seta preta) e fibroblastos (seta amarela).....	94
Figura 2.73 – Imagem histológica da raiz mesial de M1, onde se observa proliferação mesenquimatosa ao longo de todo o ligamento periodontal analisado. A angiogénese presente, visível sobre a forma de microvasos (seta preta) observa-se junto à parede alveolar. Observam-se também lacunas de reabsorção óssea direta (*) na parede alveolar sujeita a compressão que têm muito próximo linhas de reversão (seta branca) características da remodelação que está a ocorrer.....	95
Figura 2.74 – Imagem histológica mostrando o lado distal da mesma raiz mesial de M1, correspondente ao lado de tensão, onde também é visível proliferação mesenquimatosa detetada sob a forma de hiper celularidade. De salientar a existência de fenómenos de reabsorção/remodelação na parede alveolar distal (seta preta). Também se observam vasos hiperémicos, principalmente adjacentes à parede alveolar, fenómeno típico da remodelação que aqui está a ocorrer.....	95

Figura 2.75 – Imagem histológica ilustrativa dos constituintes do periodonto no lado de tensão. De salientar a presença de osteoclastos (*), traduzindo a ocorrência de fenômenos de reabsorção do tecido ósseo alveolar, bem como a existência de processos de remodelação no cimento celular. O ligamento periodontal apresenta-se conservado.....	96
Figura 2.76 – Corte histológico ilustrando os fenômenos de remodelação no cimento celular. São visíveis células com características de cementoclastos (*) e imediatamente adjacentes cementoblastos (seta) em paliçada num processo ativo de síntese.....	96
Figura 2.77 – Imagem histológica da região inter-radicular das raízes mesial e distal de M1. Observa-se reabsorção óssea direta, bem como a presença de numerosos osteoclastos (seta branca) alojados nas suas lacunas. De registrar ainda a existência de inúmeros restos epiteliais de Malassez (seta preta) distribuídos no ligamento periodontal adjacente ao cimento. É de assinalar também a presença de ossificação intramembranosa (*).....	97
Figura 2.78 – Corte histológico do lado mesial da raiz mesial de M1, onde são visíveis osteoclastos presentes em lacunas de reabsorção óssea direta (seta preta). São visíveis também linhas de reversão (seta branca) em toda a extensão da parede do osso alveolar e vasos sanguíneos hiperêmicos (*), fenômenos típicos da remodelação que está a ocorrer.....	98
Figura 2.79 – Corte histológico ilustrando o septo ósseo inter-radicular, onde são visíveis osteoclastos contidos nas suas lacunas (seta preta), sendo notória a presença de linhas de reversão (seta branca), indiciando fenômenos típicos da remodelação que aqui está a ocorrer. É também visível, neste lado do ligamento, hiperplasticidade indicando proliferação mesenquimatosas.....	98
Figura 2.80 – Imagem histológica da região inter-radicular das raízes mesial e distal de M1, onde são visíveis os fenômenos de remodelação óssea como a presença de osteoclastos (seta preta) e o aumento de vascularização (*) adjacente à parede alveolar. São também visíveis áreas de hialinização (seta branca) junto à superfície radicular.....	99
Figura 2.81 – Corte histológico ao nível do septo interdentário, sendo visível a raiz mesial de M1. Observa-se nitidamente a ocorrência de processos de neoformação óssea com os osteoblastos dispostos em paliçada (seta preta) sobre o tecido ósseo no lado de tensão. De registrar também, no lado de compressão da raiz distal (*), a fase de reversão e síntese após intensa reabsorção.....	99
Figura 2.82 – Corte histológico do lado de pressão, no qual está patente a expressão do TGF- $\beta$ 1 particularmente junto à parede alveolar em células com fenótipo de osteoblasto ou osteoblasto-like (*).....	100
Figura 2.83 – Imagem histológica na qual são visíveis cementoblastos a expressarem TGF- $\beta$ 1 junto à superfície radicular.....	100
Figura 2.84 – Aspeto histológico do lado de pressão do movimento, mostrando fibroblastos e osteoblastos a expressarem Smad2. É visível a presença de células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos perivasculares (seta) marcadas mais tenuemente. Também se observa ossificação intramembranosa (*).....	101
Figura 2.85 – Corte histológico do lado de tensão, onde se vêem fibroblastos, cementoblastos (seta) e osteócitos a expressarem Smad2.....	101
Figura 2.86 – Aspeto histológico da região do septo ósseo interdentário entre M1 e M2 e ligamento periodontal, evidenciando a expressão da Smad2, tanto no lado de tensão mesial como no lado de pressão distal. Os fibroblastos apresentam-se marcados ao longo de todo o ligamento, sendo visíveis osteócitos com forte marcação no núcleo (seta branca). É visível também a presença de células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos a marcar tenuemente para a Smad2 (seta preta).....	102
Figura 2.87 – Imagem histológica ilustrando a ausência de expressão Smad3. x400 no original.....	102
Figura 2.88 – Imagem histológica do lado de pressão, onde é visível a expressão mais intensa da IL-10 no tecido ósseo alveolar, mostrando também a forte remodelação que aqui está a ocorrer.....	103
Figura 2.89 – Aspeto histológico do lado de tensão, mostrando a intensa expressão da IL-10 no tecido ósseo alveolar, área onde também está a ocorrer uma remodelação acentuada (*). De notar que a expressão mais intensa da citocina se observa nos osteoblastos e osteócitos e, eventualmente, nas células mesenquimatosas indiferenciadas que se encontram num processo de diferenciação em osteoblastos.....	103

Figura 2.90 – Aspeto histológico do ligamento periodontal mostrando células com fenótipo de miofibroblastos (seta) e células da parede vascular a expressarem IL-10 .....	104
Figura 2.91 – Aspeto histológico do ligamento periodontal no lado de pressão, onde se observam células ligamentares a expressarem PCNA. De salientar a presença de uma imagem sugestiva de resto epitelial de Malassez (seta).....	104
Figura 2.92 – Aspeto histológico do ligamento periodontal no lado de tensão. De registar a diferença quer na intensidade da marcação quer na densidade de células a expressarem PCNA relativamente ao lado de pressão ilustrado na figura anterior .....	105
Figura 2.93 – Maior ampliação da Figura 2.91 na qual é visível, além de fibroblastos a expressarem PCNA, também uma imagem sugestiva de resto epitelial de Malassez .....	105
Figura 2.94 – Imagem histológica do ligamento periodontal, onde no mesênquima em regeneração são visíveis osteoclastos a expressarem PCNA, com a sua morfologia característica de células gigantes multinucleadas (seta).....	106
Figura 2.95 – Corte histológico do lado de pressão mesial da raiz mesial de M1, sendo visível o aspeto normalizado do ligamento periodontal com a característica orientação das fibras no sentido apical do osso alveolar para o cimento radicular. A parede alveolar apresenta também um aspeto normalizado, observando-se um osteoclasto (seta) no interior de uma lacuna de Howship .....	106
Figura 2.96 – Corte histológico do lado de tensão distal da raiz mesial de M1, surgindo o ligamento periodontal e a parede alveolar com um aspeto normalizado. É também visível a normal orientação no sentido apical das fibras periodontais desde o osso alveolar até ao cimento radicular. O cone de reabsorção visível na crista óssea corresponde a um fenómeno fisiológico normal presente neste animal experimental...	107
Figura 2.97 – Corte histológico correspondente a uma ampliação da imagem anterior, na qual é visível o aspeto normalizado do cimento, ligamento periodontal e superfície alveolar do lado de tensão .....	107
Figura 2.98 – Imagem histológica da face distal de tensão da raiz mesial de M1, sendo visível a reestruturação da anatomia do periodonto. O ligamento periodontal apresenta-se preservado com aspeto normal, tal como o cimento celular. São ainda notórias pequenas áreas de remodelação do tecido ósseo (seta).....	108
Figura 2.99 – Maior ampliação de uma área representada na figura anterior pondo em evidência a normal constituição do periodonto 96 horas após a remoção do estímulo, sendo evidente a remodelação que ocorreu nos tecidos periodontais.....	108
Figura 2.100 – Aspeto histológico da face mesial de compressão da raiz distal de M1. De registar a presença de várias lacunas de reabsorção (seta) na superfície radicular que atingem a dentina .....	109
Figura 2.101 – Maior ampliação da imagem anterior onde são visíveis várias lacunas de reabsorção (seta) na superfície radicular que atingem a dentina. De salientar o aspeto desorganizado do ligamento periodontal e a presença de vasos sanguíneos (*) .....	109
Figura 2.102 – Aspeto histológico da face mesial de pressão da raiz distal de M1, no qual é visível um processo de ossificação intramembranosa (*) típico da reparação por regeneração do tecido ósseo que está a ocorrer ...	110
Figura 2.103 – Imagem histológica ilustrando células com fenótipo de osteoblastos ou osteoblastos-like a expressarem TGF- $\beta$ 1 numa área onde ativamente está a ocorrer ossificação intramembranosa.....	111
Figura 2.104 – Imagem histológica mostrando cementoblastos a expressarem TGF- $\beta$ 1 .....	111
Figura 2.105 – Imagem histológica de células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta) adjacentes a metarteríolas presentes no mesênquima a expressarem TGF- $\beta$ 1 .....	112
Figura 2.106 – Aspeto histológico do lado de pressão no qual são visíveis fibroblastos, osteócitos (seta branca) e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta preta) a expressarem Smad2.....	112
Figura 2.107 – Aspeto histológico do lado de tensão, no qual são visíveis fibroblastos, cementoblastos (seta branca) e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta preta) a expressarem Smad2.....	113
Figura 2.108 – Aspeto histológico do mesênquima, onde se observa a expressão Smad2 por fibroblastos e células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta preta). x400 no original.....	113

Figura 2.109 – Imagem histológica mostrando a ausência de expressão da Smad3 .....	114
Figura 2.110 – Aspeto histológico do lado de pressão, no qual são visíveis fibroblastos a expressarem mais tenuamente do que os osteoblastos e cementoblastos a IL-10.....	114
Figura 2.111 – Aspeto histológico do lado de tensão, no qual são visíveis fibroblastos a expressarem mais tenuamente a IL-10 que os osteoblastos e cementoblastos. Visíveis também células mesenquimatosas indiferenciadas/péricitos (seta) a expressarem a citocina .....	115
Figura 2.112 – Aspeto histológico do ligamento periodontal mostrando células com fenótipo de miofibroblastos junto à superfície radicular a expressarem $\alpha$ -Sma .....	115
Figura 2.113 – Aspeto histológico do ligamento periodontal, mostrando a expressão da $\alpha$ -Sma por células musculares lisas de uma metarteríola e por algumas células do ligamento periodontal, presumivelmente miofibroblastos .....	116
Figura 2.114 – Aspetos histológicos do periodonto do lado de pressão (A) e do lado de tensão (B), onde se observa uma expressão moderada do PCNA nos fibroblastos do ligamento periodontal. De notar a diferença na densidade das células marcadas, sendo esta muito menor no lado de tensão .....	116

**Listagem de Tabelas**

Tabela II.1 – Esquematização do protocolo experimental.....	54
Tabela II.2 – Resumo do protocolo correspondente a cada anticorpo.....	58
Tabela II.3 – Anticorpos utilizados no estudo.....	58
Tabela II.4 – Resumo do número de animais eliminados do estudo e do número de elastómeros que não mantiveram a sua posição.....	60
Tabela II.5 – Resumo da histopatologia mais importante observada no ligamento periodontal e osso alveolar ao longo dos quatro períodos experimentais .....	117

