

**Andrea Castilho Soares de Azevedo**

**Revisão sobre os aspectos biológicos no ligamento  
periodontal e osso alveolar associado a compressão “ *in  
vitro*”**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de São Paulo  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências no Programa de Pós-  
Graduação em Cirurgia Translacional**

**SÃO PAULO**

**2018**

**Andrea Castilho Soares de Azevedo**

**Revisão narrativa sobre os aspectos biológicos no  
ligamento periodontal e osso alveolar associado a  
compressão “*in vitro*”.**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de São Paulo  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências no Programa de Pós-  
Graduação em Cirurgia Translacional**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira**

**COORIENTADOR: Prof. Antonio Carlos Aloise**

**SÃO PAULO**

**2018**

Soares de Azevedo, Andrea Castilho.

**Revisão sobre os aspectos biológicos no ligamento periodontal e osso alveolar associado a compressão “ in vitro** Andrea Castilho Soares de Azevedo .São Paulo, 2018  
XII, 74f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Review of biological aspects in the periodontal ligament and alveolar bone associated with compression "in vitro"

1.Ligamento periodontal, 2.Osteoclastogênese. 3.Força Ortodôntica, 4.Fibroblastos

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM  
CIRURGIA TRANSLACIONAL**

**COORDENADORA: Profa. Dra. Lydia Masak Ferreira**

## **DEDICATÓRIA**

**À minha família** por todo o apoio nas minhas escolhas, pela força e pelo carinho que sempre me prestaram ao longo de toda a minha carreira.

**Aos meus amigos** Endrigo Bastos e Marcelo Melo pelos conselhos e incentivo aos estudos

## **AGRADECIMENTOS**

**À Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. LYDIA MASAKO FERREIRA, Profa Titular**  
**Disciplina Cirurgia Plástica UNIFESP** pela orientação prestada, pelo seu incentivo, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou. Aqui lhe exprimo a minha gratidão.

**Ao Prof. ANTONIO CARLOS ALOISE , Professor Afiliado da**  
**Disciplina de Cirurgia Plástica da Unifesp** pela sua paciência, pelo seu incentivo, pela sua disponibilidade e igualmente pelo seu apoio na elaboração deste trabalho.

**Aos meus amigos e colegas de pós graduação** que de uma forma direta ou indireta, contribuíram ou auxiliaram na elaboração do presente estudo, pela paciência, atenção e força que prestaram .

**À todos os professores do Programa de PÓS GRADUAÇÃO em**  
**Cirurgia Translacional**, pelas colaborações durante as apresentações nas reuniões da PG.

**Às secretarias do programa de PÓS GRADUAÇÃO** que sempre me deram suporte e ajuda quando necessário.

# SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	ii
AGRADECIMENTOS	iii
LISTAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1.INTRODUÇÃO	02
2.OBJETIVO	07
3.LITERATURA	09
4. MÉTODO	47
5.RESULTADOS	51
6.DISSCUSSÃO	53
7.CONCLUSÃO	59
8.REFERÊNCIAS	61
9.ANEXOS	73

## **Lista de abreviaturas**

COL-1- colágeno tipo I

ERK sinal extracelular regulado pela quinase

LP Ligamento Periodontal

MDO Movimentação dentária ortodôntica

MMP-1 matriz de metaloproteinase

OPG Osteoprotegrina

RANK Receptor ativador de fator kB

RANKL Receptor ativador de fator nuclear kB ligante

TRAP fofatase ácida resistente a tartarato

TIMP-1 inibidor da metaloproteinase



## RESUMO

**Introdução:** As forças ortodônticas aplicadas aos dentes geram complexos padrões de carga mecânica, compreendendo deformações compressivas, de tração e de cisalhamento que, por sua vez, provocam respostas biológicas diversas e complexas nos tecidos periodontais imediatamente ao redor dos dentes carregados. **Objetivo:** O presente estudo objetiva analisar os impactos da força compressiva em Odontologia. **Método:** Para tanto, como metodologia, emprega a revisão de literatura em artigos científicos publicados em periódicos que discutem o tema em análise. **Resultado:** Foi visto que embora estudos prévios tenham relatado diversos fatores relacionados à eficiência do tratamento ortodôntico, o fator mais controlável na prática para se obter a máxima biorresposta dentro do periodonto é a magnitude da força aplicada aos dentes. **Conclusão:** Ao final do estudo concluiu-se que força compressiva intermitente estimula a reabsorção óssea no tratamento ortodôntico. No entanto deve-se evitar a alta força compressiva na Ortodontia para evitar danos aos tecidos, enquanto a força compressiva moderada possibilita a remodelação tecidual ativa e a movimentação dentária.

Palavras-chave: Ligamento periodontal, Osteoclastogênese , Força Ortodôntica , Fibroblastos

## ABSTRACT

**Introduction:**The orthodontic forces applied to the teeth generate complex patterns of mechanical loading, comprising compressive, tensile and shear deformations which, in turn, elicit diverse and complex biological responses in the periodontal tissues immediately around the loaded teeth. **Aim:**The present study aims to analyze the impact of compressive force on dentistry. **Methods:**In order to do so, as methodology, it uses the literature review in scientific articles published in periodicals that discuss the subject under analysis. **Results:** It was seen that although previous studies have reported several factors related to the efficiency of orthodontic treatment, in practice, the most controllable factor to obtain the maximum bio-response within the periodontium is the magnitude of the force applied to the teeth. **Conclusion:**At the end of the study it was concluded that intermittent compressive force stimulates bone resorption in orthodontic treatment. However, high compressive strength in orthodontics should be avoided to avoid tissue damage, while moderate compressive force enables active tissue remodeling and tooth movement.

**Key words:** Periodontal ligament, Osteoclastogenesis, Orthodontic force, Fibroblasts



## 1-Introdução

Os tecidos periodontais possuem a capacidade de induzir a remodelação e estimular modificações na matriz extracelular, como resposta à aplicação de forças no ligamento periodontal e no osso alveolar. As fibras colágenas são os principais componentes dessa matriz e são responsáveis pela conexão desse tecido (Arceo et al., 1991) . A remodelação tecidual requer uma degradação das proteínas para permitir uma reabsorção desse tecido e esta é diretamente dependente de enzimas chamadas de metaloproteinases, capazes de degradarem a maioria das proteínas desse sistema e reguladas por alguns inibidores dessas enzimas. Esse sistema é modulado entre a ação das enzimas e de seus inibidores e esse equilíbrio é fundamental para que haja integridade e saúde do tecido ( Lisboa et al .,2008). Quando esse equilíbrio é afetado ocorre uma desestabilização e situações patológicas podem surgir como : periodontite, artrite reumatóide, câncer, malformações (Hacopian et al., 2011).

Questões que avaliam a reabsorção e formação óssea e quais as moléculas envolvidas nesse processo são levantadas sobre as possíveis diferenças de comportamento tecidual gerado ao redor desse sistema. Durante a mastigação por exemplo, as forças mecânicas transferidas para os dentes, são dissipadas através do ligamento periodontal (LP). Os estudos histológicos do tecido ao redor dos

dentes, mostram que durante uma força temos uma tensão associada a formação óssea e do outro lado uma compressão induzindo uma reabsorção óssea (Meikle et al., 2006). As pesquisas no campo da biologia celular buscam muitas vezes identificar quais as moléculas estão presentes durante esse processo de diferenciação celular quando submetidos à diferentes tipos de cargas durante a movimentação dentária. Os estudos também simulam in vitro a fisiologia desses tecidos in vivo, tendo suas cargas aplicadas diretamente sobre as células (sistema 2D) . A cultura dos fibroblastos por exemplo permite que os mesmos funcionem como unidades dependentes e estes são capazes de crescer e se dividirem normalmente, de forma similar in vivo , isto se , esses receberem os nutrientes necessários para seu crescimento. Os fibroblastos necessitam ligar-se ao seu substrato para se dividir e crescer , caso contrário eles param de proliferar e morrem ( Moraes et al 2009).

Como justificativa em relação ao cultivo bidimensional, o cultivo em 3D poderia ser uma opção nas terapias periodontais e periimplantares que necessitem de aumento do tecido gengival , por exemplo.

Para a engenharia tecidual são necessários três elementos: cultivo de células apropriadas , matriz confeccionadas em colágeno, osso ou polímeros sintéticos e adição de mediadores solúveis com fatores de crescimento e adesinas. ( Ueda et al .,2000). Essas matrizes devem apresentar integridade estrutural para que se formem novos tecidos ( Lee et al., 2007) . Estes estudos acreditam que o cultivo

de células em placas e garrafas contendo o meio de cultura que fornecem nutrientes para a viabilidade celular tem suas limitações no que se diz respeito ao transporte dessas células para um sítio receptor de um ser humano por exemplo. Os carreadores, forneceriam um aspecto tridimensional para a cultura e proliferação celular, e seriam ideias para o apoio e a invasão dos fibroblastos (Zacchi et al., 1998). Como justificativa em relação ao cultivo bidimensional, o cultivo em 3D poderia ser uma opção nas terapias periodontais e periimplantares que necessitem de aumento do tecido gengival, por exemplo.

As cargas elevadas podem reduzir a viabilidade celular, causando necrose ou dano tecidual expressivo, ao passo que as células do tecido periodontal podem desenvolver atividade osteoblástica quando submetidas ao estresse mecânico (Wescott et al., 2007). A carga sobre esse sistema poderia estimular uma remodelação que induziria a osteoclastogênese responsável pela diferenciação, proliferação celular e a expressão da matriz extracelular (Romer et al., 2009).

Como moléculas nessa remodelação óssea temos a osteoprotegerina (OPG), receptor ativador de fator kB (RANK), e receptor ativador de fator nuclear kB ligante (RANKL). Assim como via importante temos o RANKL/OPG/RANK. Esse sistema desempenha um papel chave na reabsorção óssea e pode ser modificado pelos osteoblastos, cementoblastos e osteoclastos. (Kearns et al., 2008 e Lossdorfer et al., 2011). O RANKL é quem facilita a reabsorção óssea através

dos osteoclastos e ativa a maturação óssea (Yasuda et al., 1998). Os osteoblastos também produzem a OPG que atua como um receptor para o RANKL e posteriormente inibe a reabsorção óssea.

O tempo de aplicação das carga é considerado como um evento importante presente na osteoclastogênese (Lee et al., 2007 e Hacopian et al., 2011). As células do ligamento tem a capacidade de expressarem citocinas que inibem a expressão dos receptores de osteoclastos, e estas são induzidas durante uma inflamação. (Scheres et al., 2011)

Nessa presente revisão de literatura foram selecionados artigos que descrevem sobre esses eventos biológicos que ocorrem no ligamento periodontal e osso alveolar e de que forma o meio de cultura poderia influenciar na expressão das moléculas envolvidas durante a aplicação de uma carga sobre esse sistema.

Objetivo



## 2- Objetivo

Revisar a literatura dos últimos 10 anos sobre os modelos de compressão “in vitro” de fibroblastos periodontais humanos cultivados .

Literatura

### 3- Literatura

O citoesqueleto é uma estrutura dinâmica que compreende três elementos poliméricos principais: microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários, organizados em uma rede que fornece resistência à deformação induzida por estresse. A arquitetura da estrutura determina o comportamento mecânico do citoesqueleto e as propriedades físicas da célula. O citoesqueleto gera, transmite e responde a estresses mecânicos internos e externos, e através da rede do citoesqueleto, estímulos mecânicos medeiam a forma, a motilidade, a diferenciação, a sobrevivência e, por fim, o comportamento celular. Em resposta às forças aplicadas, a rede do citoesqueleto enrijece, resistindo assim à deformação adicional, e se reorganiza para manter a integridade celular (FLETCHER et al., 2010).

No contexto da movimentação dentária ortodôntica ( MDO ), as tensões de compressão, tração ou cisalhamento induzidas por carga ortodôntica causam alterações dinâmicas dentro da matriz extracelular e dentro do citoesqueleto das células, no microambiente local. A cepa induzida por estresse medeia a proliferação, diferenciação, motilidade e morfologia de osteoblastos, osteoclastos e outras células no ligamento periodontal ( LP ) e no osso alveolar, bem como na

produção de citocinas e fatores de crescimento. Todos estes juntos determinam o equilíbrio entre a reabsorção óssea e a formação, influenciando a remodelação local do tecido que permite o movimento dentário em resposta às cargas ortodônticas aplicadas (DRASDO et al., 2012).

## 2.1 Estudos em 2D

Muitos estudos avaliaram a compressão mecânica aplicada diretamente sobre as células e como essas gerariam respostas frente a estes estímulos. Esses estudos diferem entre si em vários contextos. Destacam-se entre as diferenças o modelo utilizado para aplicar essas cargas, a magnitude dessa cargas, o tempo de aplicação, e a maneira: contínua e estática e quais as vias de sinalização estariam sendo estudadas.

### 2.1.1 Forças cíclicas:

O estresse de cisalhamento pode surgir no LP durante a aplicação de forças de tração ou compressão. Isso pode ser em parte devido à estrutura fibrosa do tecido conjuntivo que ocupa o espaço periodontal , bem como à superfície irregular do osso alveolar. Quando comparamos tensão e compressão e tração , as forças de cisalhamento atuam sobre uma área que está alinhada com as forças.

A centrifugação tem sido utilizada como um estímulo mecânico e baseia-se na aplicação de tensão de cisalhamento de fluidos aos meios de cultura; influenciando tanto na mecanotransdução como na respostas desse tecido. A centrifuga é capaz de aplicar forças de cisalhamento a células cultivadas. Como o dano celular é uma questão importante no estudo da resposta celular às cargas mecânicas aplicadas, mede-se a viabilidade celular em todas as condições.

KAWAGUCHI et al. (2000) estudaram a citocina e questionaram sobre sua ação na remodelação óssea. Concluíram que as baixas concentrações de citocina agem diretamente nos osteoclastos maduros agindo na reabsorção óssea, de forma moderada, enquanto que em altas concentrações o fator de crescimento fibroblasto atuava no osteoblastos. O estiramento mecânico cíclico induziria uma expressão do fator de crescimento de fibroblastos no ligamento periodontal. Essa força produz fatores de reabsorção como as prostaglandinas E2 e interleucina-1 e como resultado o osso alveolar é reabsorvido no lado da compressão durante o movimento ortodôntico.

ROBLING et al (2001) afirmam que a reaplicação de força parece afetar significativamente a expressão gênica, o que indica que a ativação frequente de forças de curta duração pode realmente inibir o processo de remodelação e para isso necessita de algumas horas para que as células restaurem a mecanossensibilidade .

MYOKAI et al. (2003) submeterem células a diferentes porcentagens de alongamento pelo uso de uma unidade de esforço Flexercell. Esse método foi utilizado para investigar a resposta das células à estimulação mecânica. Durante o movimento ortodôntico o ligamento periodontal humano sofre mais do que forças de tração no lado de tensão e uma força de compressão no lado da pressão. Como faixa ideal para a aplicação da força optaram por trabalhar com 90% de viabilidade celular usando corante azul tripan, assegurando que as forças mecânicas aplicadas de forma contínuas e interrompida não danificasse as células cultivadas. Usaram tempo de 30 e 60 minutos para estimular genes Col-1 e MMP-1 respectivamente, mas não obtiveram efeito na expressão do gene TIMP-1. Os diferentes resultados observados nesse estudo provavelmente se devem aos diferentes tipos de forças aplicadas às células. As forças intermitentes são geralmente consideradas mais adequadas para simular uma movimentação ortodôntica, porque o tecido periodontal pode se reparar após um período de turnover.

Chiba et al. (2004) mostraram uma mudança na orientação dos microtúbulos das células do ligamento periodontal, em resposta ao alongamento cíclico, o que poderia representar um mecanismo de autoproteção sugerindo que mais experimentos com diferentes durações de períodos de descanso entre os ciclos de carga seriam necessários para esclarecer ainda mais esse fenômeno.

RIOS et al. (2008) desenharam um estudo para determinar o papel da periostina

no ligamento periodontal humano como manutenção da função desse tecido durante a influência de uma carga mecânica. Analizaram o efeito da hipofunção dessa enzima no periodonto em camundongos com periostina nula. Escolheram a redução oclusal mecânica para induzir uma hipofunção oclusal. Apontam como esse método sendo o mais reprodutível e menos invasível. A ausência de periostina provocou perda reversível de integridade e comprometimento da fixação dos ameloblastos na camada epitelial. A expressão de periostina aumenta em áreas de compressão e diminui em áreas de tensão nesse modelo dentário. Nos camundongos sem a periostina desenvolveram-se defeitos periodontais graves após os dentes irromperem e participarem da oclusão. Assim, essa via sugere um mecanismo regulador de feedback mecânico da expressão gênica importante para a integridade periodontal. Nesse mesmo estudo, analisaram *in vitro* a capacidade de fibroblastos do LP humano em responder à tensão mecânica para regular a expressão de periostina e, portanto, regular a sua disponibilidade durante a função oclusal normal. Acreditam que o alongamento do substrato das células representa um método validado para a força tensional que imita de perto a tensão a qual o ligamento periodontal é submetido durante a mastigação ou movimento dentário. Relatam um aumento na expressão da periostina durante a aplicação da carga, que diminui após a cessação desta. Também relatam um aumento na mensagem para o TGF- $\beta$ , uma citocina multifuncional que se mostrou ser um indutor potente da expressão da periostina. O uso do anticorpo neutralizante para a TGF- $\beta$ 1

bloqueou completamente os efeitos da carga na expressão da periostina. Esses dados sugerem que a carga mecânica provavelmente ativa o TGF- $\beta$ 1 em seu complexo latente, que, por sua vez, estimula a produção de periostina. Os dados in vivo e in vitro destacam a importância funcional da periostina na manutenção da integridade estrutural do periodonto durante a função oclusal.

KOOK et al. (2009) relatam que os fibroblastos do ligamento periodontal, ao contrário dos fibroblastos gengivais, induzem número de células multinucleadas positivas para TRAP em co-cultura com células de medula óssea de ratos. Além disso, a força centrífuga estimulou a produção de OPG nestas células e inibiu a formação de células semelhantes a osteoclastos, que estava intimamente associada às vias mediadas por ERK. Reconhecem que os fibroblastos do ligamento gengival e periodontal são funcionalmente diferentes, mas podem ter efeitos duplos. Estes são capazes de induzir a formação de células semelhantes a osteoclastos e também inibi-lo de acordo com as condições examinadas. Os fibroblastos gengivais induzem menos células positivas para TRAP em resposta à estimulação com IL-1 do que os fibroblastos do ligamento periodontal e são superiores na inibição da formação de células semelhantes a osteoclastos do que os fibroblastos do ligamento periodontal.

A combinação de dexametasona e vitamina D é crítica na formação de células semelhantes a osteoclastos em um sistema de co-cultura com fibroblastos do ligamento periodontal. Como tal, muitos estudos mostraram que ambos os



compostos são essenciais para o desenvolvimento adequado de osteoclastos ativos em co-culturas com células osteoblásticas (GRIMAUD et al., 2003) bem como com fibroblastos periodontais (LIU et al., 2003 ;VRIES et al., 2006). O estudo fornece evidências de que os fibroblastos do ligamento periodontal humano são superiores na indução de células semelhantes a osteoclastos do que os fibroblastos gengivais. A força centrífuga inibe a formação de células semelhantes a osteoclastos através da produção da OPG , onde a sinalização mediada por ERK estaria intimamente envolvida.

O trabalho de HACOPIAN e NIK (2011) analisou os efeitos da força centrífuga na transcrição do colágeno tipo I (COL-1), da matriz de metaloproteinase (MMP-1) , e do inibidor da metaloproteinase ( TIMP-1) em fibroblastos do ligamento periodontal. A força exercida sob essas células foi de 36.3g/cm<sup>2</sup> durante 30, 60 e 90 minutos. Essa carga também foi realizada durante 3 vezes por 30 minutos e 6 vezes por 15 minutos. A codificação do RNAm para Col-1, MMP-1 e TIMP-1 foram quantificados através do PCR. Houve um aumento nos níveis de COL-1 e MMP-1 quando a força exercida durou 30 minutos e 60 minutos respectivamente. A força com a interrupção não demonstrou efeitos expressivos nos genes. Assim, os resultados mostraram que a força contínua pode ter um bom efeito induzindo uma expressão gênica durante o processo de remodelação do ligamento periodontal comparado com a força com pequenas interrupções por curtos períodos.

NOKHBEHSAIM et al. (2012) conferem como principal e nova a descoberta que a carga biomecânica e um ambiente pró-inflamatório modulam os efeitos anti-inflamatórios de um enxerto de hidroxiapatita. Enquanto o enxerto em citocinas pró-inflamatórias foram aumentadas sob condição inflamatória simulada, nenhuma inibição significativa dessas moléculas foi observada na presença de alta carga biomecânica. Esses achados sugerem que altas forças oclusais podem possivelmente anular os efeitos anti-inflamatórios do enxerto e, portanto, deveriam ser evitados para alcançar melhores resultados de cicatrização. Eles queriam estudar a influência da carga biomecânica nos possíveis efeitos anti-inflamatórios exercidos por um enxerto, e para isso aplicaram a tensão de tração. Num cenário clínico, as células do ligamento periodontal estariam sujeitas a forças complexas, isto é, tensão, compressão e cisalhamento.

#### 2.1.2 Força estática contínua:

O estudo de KAZANKI et al. (2002) sugeriu um novo modelo com o mecanismo de indução da osteoclastogênese em uma movimentação ortodôntica. Eles utilizaram fibroblastos e estudaram o sinal de estresse mecânico gerado nessas células quando submetidas à uma compressão estática contínua. Afirmam que as células do ligamento periodontal possuem alta atividade de fosfatase alcalina e por serem células multipotentes poderiam ser usadas *in vitro* e mimetizar o sistema *in vivo*. A força de compressão estática e contínua poderia

induzir a osteoclastogênese e portanto seria um método simplificado e aplicável em laboratório. Como análise dessa expressão gênica utilizaram do RT-PCR semiquantitativo para estudar a molécula alvo e a liberação de citocinas durante o estresse mecânico.

Utilizou-se cilindros de vidro com cargas de 0,5 , 1, 2 e 3g/cm<sup>2</sup> nos tempos de 0.5, 1.5, 6, 24 e 48 horas. A força compressiva estática aumentou a osteoclastogênese regulando positivamente a expressão de RANKL. Além disso, as células do ligamento periodontal tiveram uma expressão aumentada de RANKL com o aumento da carga e a PGE2 teve um aumento dependente do tempo. O ligamento periodontal sob compressão exibiu uma expressão aumentada de RNAm de RANKL de uma maneira dependente da força e do tempo.

Os resultados desse estudo se comparado com outros que usaram o mesmo modelo de compressão a aplicação do estresse compressivo mecânico estático concordam que esse sistema induz a formação de osteoclastos através da ativação do sistema RANKL-RANK, e que necessita de contato célula a célula.

A expressão de OPG nas células não foi afetada pelo estresse mecânico , eles acreditam que a atividade osteoclastogênica dessas células sejam menores que outras linhagens.

GRIMAUD et al. (2003) demonstraram que a relação RANKL / OPG estava significativamente aumentada em pacientes com osteólise grave em comparação ao grupo controle e que esse desequilíbrio está envolvido nos mecanismos de

reabsorção óssea.

CROTTI et al. (2003) demonstraram que níveis significativamente mais elevados de proteína RANKL foram expressos na doença periodontal. No entanto, a proteína OPG foi significativamente menor nos tecidos periodontais do que no grupo saudável .

Estes trabalhos apontam que um desequilíbrio no sistema RANKL/OPG pode exercer função direta sobre a doença periodontal e que esse sistema também está envolvido diretamente na remodelação óssea durante o movimento ortodôntico. Os estudos anteriores afirmam que a compressão aumenta significativamente a secreção de RANKL e diminuiu a de OPG de maneira dependente do tempo e da magnitude.

Posteriormente surgiram estudos que indicavam que o estresse mecânico, isto é, a força de tração regula positivamente o RNAm da OPG de maneira dependente de força , enquanto a expressão de OPG permanecia constante sob força compressiva (KANZAKI et al., 2002).

NUKAGA et al (2004) relatam que a expressão de RANKL é principalmente dependente de COX-2, e ao se utilizar um inibidor específico para COX-2 tiveram a expressão de RANKL diretamente dependente da produção de PGE-2. Portanto, pode haver outra via de RANKL estimulada por força de compressão nas células do ligamento periodontal humano, enfatizando que a osteoprotegerina é um membro da família de receptores do fator de necrose tumoral e é conhecida

por inibir a osteoclastogênese e a função dos osteoclastos.

NISHIJIMA et al (2006) também relata em seu estudo uma compressão feita sob células do ligamento periodontal com o mesmo modelo proposto por Kanzanki. No estudo eles relatam aumento na expressão de RANKL e diminuição da expressão de OPG , que vai de acordo com estudo anterior. Quando o tempo foi aumentado, passando para 168h os níveis de RANKL e OPG haviam retornado a níveis básicos, eles associam essa baixa da resposta ao desenho experimental, que não conseguiria promover uma força contínua e consistente durante todo o período experimental de 168h .

NAKAOS et al (2007) demonstraram que a força intermitente de 2g/cm<sup>2</sup> induz uma maior expressão de RANKL e IL-1 e um menor dano celular que a força contínua em células do ligamento periodontal humano. Eles também destacam que a expressão de RANKL com uma força de compressão é modulada por IL-1. Eles criaram um novo método para aplicar a pressão aumentando a quantidade do meio para criar uma pressão hidráulica. Enfatizam que este método aplicaria uma força compressiva uniforme in vitro, enquanto provê nutrição suficiente para as células. Utilizaram as cargas de 2,0 e 5,0 g/cm<sup>2</sup> consideradas adequadas e com menor índice de morte celular. Para a força intermitente o tempo utilizado foi de 8 horas. Após 4 dias, o nível de RNAm da OPG foi menor nas células submetidas à força intermitente de 2,0 g/cm<sup>2</sup> do que nas submetidas à força contínua de 2,0 g/cm<sup>2</sup>. Embora a força compressiva tenha reduzido a expressão de OPG , seu

efeito foi menor no nível de RNAm da OPG do que nos níveis de RNAm de RANKL e IL-1.

Uma força intermitente promove a expressão de IL-1 que envia um sinal aumentando a expressão do RANKL e induzindo a osteoclastogênese. Concluem que, uma força intermitente fraca poderia induzir a expressão de RANKL através da expressão de IL-1 em células do ligamento periodontal humano humanas sob forças de compressão ideias.

HENNEMAN et al (2008) desenvolveram um trabalho onde o tempo é utilizado como referência para muitas pesquisas, como um tempo ideal para se obter uma maior viabilidade celular. A mecanossensibilidade começa a diminuir logo após o início da carga e as células precisam de algumas horas para restaurar a mecanossensibilidade. Os pesquisadores afirmam que a recuperação do dano celular após o carregamento pode resultar em menos dano celular e que 8 horas de aplicação de força são adequadas para a simulação de condições clínicas.

NAKAJIMA et al (2008) investigaram o mecanismo de alteração do fator de crescimento de fibroblastos em células do ligamento periodontal humano no lado da compressão durante um movimento dentário ortodôntico, e os seus achados sugeriram que a força de compressão acelerou a secreção de fibroblastos. Ele usou cargas de 0.5, 1, 2, 3 e 4 g/cm<sup>2</sup> por até 24 horas, como no modelo Kazanki. A força de compressão aumentou a secreção do fator de crescimento de fibroblastos de maneira dependente do tempo e magnitude da carga, além disso, a expressão

de força de compressão aumentou significativamente a secreção do fator de crescimento de fibroblastos-2 de maneira dependente do tempo e da magnitude. O fator de crescimento foi aumentado para todas as cargas em todos os tempos. A expressão de RANKL também foi aumentada e a OPG também foi aumentada em relação ao tempo e carga, porém com uma secreção maior se comparada com outro grupo. O anticorpo do fator de crescimento inibiu a secreção RANKL em 49% e OPG 66%.

BLOEMEM et al (2009) , publicaram um estudo sobre os fibroblastos do ligamento periodontal e a relação da movimentação dentária com a expressão gênica durante a osteoclastogênese. Os autores demonstraram que a interação entre o sistema RANK e RANKL induz uma série de alterações celulares que participam na diferenciação dos osteoclastos. A cultura de fibroblastos do ligamento periodontal com células mononucleares do sangue resultou num aumento de mais de 10 vezes da expressão de molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) em comparação com a expressão de RNAm. Quando foi analisada a expressão para o contato de célula a célula, não se obteve um resultado significativo, indicando que a adesão heterotípica, entre as células de diferentes tipos é necessária para o aumento da expressão do gene. Conclui-se nesse estudo que a adesão entre os precursores de osteoclastos e fibroblastos dos ligamentos periodontais modula a resposta celular favorecendo a expressão dos genes de diferenciação de osteoclastos e a formação final destes.

KOOK et al. (2009) estudaram o potencial osteoclastogênico da força mecânica nos fibroblastos do ligamento periodontal mediados pela osteoprotegerina. Os autores compararam a capacidade do fibroblasto periodontal em estimular a diferenciação osteoclástica de monócitos retirados da medula óssea de ratos e investigaram os efeitos das forças mecânicas sobre a produção de RANKL e OPG nessa população de fibroblastos. Os fibroblastos dos ligamentos periodontais produziram um maior número de células semelhantes aos osteoclastos, e esta foi aumentada quando houve a adição do anticorpo anti-OPG. Após 4h de aplicação de força centrífuga entre os tempos de 30-90min mediu-se os níveis de RANKL e OPG, e estes foram aumentados de forma diretamente proporcional ao aumento da força.

SANUKI et al. (2010) também relata o efeito promotor da força compressiva na expressão de COX-2 e aumentaram a síntese de PGE2 nos osteoblastos. A administração de um inibidor específico de COX-2 a uma cultura osteoblástica diminuiu a diferenciação de células RAW264.7 em células semelhantes a osteoclastos. A produção aumentada de RANKL induzida por uma força compressiva e estímulo bacteriana induziu a produção de PGE2.

YAMAMOTO et al. (2011) estimulou células do ligamento periodontal com *Porphyromonas gingivalis* e pressão hidrostática. Ele relata que a produção de IL-8 foi induzida por estresse mecânico, e a presença simultânea de forças compressivas e *P. gingivalis* levou a uma superprodução de IL-8 em células PDL,



sugerindo que alguns genes mecanicamente regulados por essas células são responsivos à estimulação bacteriana gram-negativa.

MITSUHASHI et al. (2011) , estudaram os efeitos da proteína 70 (HSP 70) na expressão do RNAm do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e do receptor ativador de fator nuclear  $\kappa$ B Ligante (RANKL) induzidos por forças compressivas nas células do tecido periodontal. Essas células foram comprimidas em cargas de 2g ou 4g durante 24 horas e foram tratadas com a proteína recombinante 70 por 12 horas. A produção dessa proteína foi avaliada pelo sistema ELISA. Como resultado desse trabalho houve um aumento da expressão do RNAm para HSP70 , TNF- $\alpha$  e RANKL para 9 e 12 horas. Para 12h teve um decréscimo da produção de TNF- $\alpha$  e RANKL ao passo que HSP70 mostrou um aumento. Seus resultados mostraram que a proteína HSP70 pode modular a expressão do RNAm do TNF- $\alpha$  e RANKL nas células do ligamento periodontal durante a compressão destas.

DIERCKE et al. (2011) estudaram a correlação entre a compressão e a dependência na osteogênese com relação a epinefrina-A2. A ativação da epinefrina sinaliza a inibição dos osteoblastos e a ativação dos osteoclastos causando uma reabsorção óssea. Foram comprimidas células do ligamento periodontal através de força estática com carga de 30.3g/cm<sup>2</sup>. Essa força induziu significativamente a expressão da epinefrina A2, ao passo que a epinefrina B2, também avaliada, não obteve expressão. Os osteoblastos do osso alveolar foram estimulados com a epinefrina A2 e teve um decréscimo na diferenciação

osteoblástica.

KOOK et al. (2011) concluíram que as forças aplicáveis aos dentes e suas bases ósseas possuem características específicas e com variações da carga e sua magnitude, duração e direção de forma que estas promovem reabsorção e aposição do osso alveolar. Essas forças que agem diretamente sobre a remodelação óssea provocam um stress mecânico nas diferentes células que formam o tecido ósseo e o ligamento periodontal.

NOKHBEHSAIM et al. (2012) estudaram uma matriz derivada do esmalte que promove regeneração periodontal e sua capacidade de apresentar efeitos anti-inflamatórios. Para isso eles avaliaram in vitro a resposta inflamatória dessa matriz quando utilizada cargas compressivas sob esta. Após receberam essa matriz de esmalte, as células do tecido periodontal foram estimuladas em diferentes meios: inflamação através da Interleucina-1b (IL-1b), compressão desse meio com uma carga baixa e outra alta, e num grupo controle normal sem indução. A expressão gênica foi avaliada através do PCR. Essa matriz foi significativamente sub-regulada pela expressão de IL-1b e COX-2 no primeiro dia, e IL-6 , IL-8 e COX-2 durante 6 dias em condições normais. No quadro inflamatório a ação anti-inflamatória da matriz melhorou bem a situação durante 6 dias. No grupo que recebeu forças leves, a matriz causou uma baixa expressão da IL-1b e IL-8, porém para altas cargas a ação anti-inflamatória da matriz foi anulada tanto para o primeiro dia como para o sexto dia. Dessa forma, esse estudo

concluiu que altas cargas podem impedir a ação anti-inflamatória da matriz e que esta deveria ser evitada imediatamente após a utilização dessa matriz para se obter os melhores resultados.

ROMER et al. (2013) relata que a bactéria *A. Actinomycetemcomitans* (AA) inativada pelo calor induz a produção de COX-2 a partir de células do ligamento periodontal, e conseqüentemente a concentração de PGE2 aumentou no ambiente de cultivo de células. A COX-2 não é apenas induzida pela estimulação bacteriana, mas também pelo estresse mecânico gerado ao redor dos osteoblastos. A força aumentou COX2 em 5 vezes e para o grupo com AA o aumento foi em 56 vezes. A PGE2 também teve um aumento com indução da carga e quando associados com bactéria foi maior e a completa ausência de PGE-2 confirmou a inibição de COX-2, com redução de RANKL.

ARAUJO et al. (2015) acreditam que a modelação do tecido ósseo é promovido pelos osteoclastos e que a quantificação da irregularidade dessa superfície pode ser medida por uma análise fractal para detectar o nível de atividade osteoclástica. Eles concluíram que esse tipo de análise é um método com bom potencial nos exames microscópicos. As avaliações histológicas apresentam de um lado uma tensão associada à formação óssea e um lado de compressão associado à reabsorção óssea. As células do ligamento periodontal representam uma composição celular heterogênea, sendo os fibroblastos predominantes e cercados por cementoblastos, osteoblastos e osteoclastos.

JIANRU et al. (2015) analisaram aspectos relacionados à intensidade das forças mecânicas aplicadas sobre o periodonto. As forças aplicadas quando ideais, resultam em menor necrose tecidual, preservando células viáveis melhorando os resultados clínicos, sendo numa movimentação ortodôntica ou numa reparação tecidual em uma região que recebe compressão. O estudo analisou a influência da CaMK, classe de enzimas de proteína quinase dependente de  $Ca^{2+}$  / calmodulina na modulação da expressão de osteopogerina, RANKL e NFATC2 no ligamento periodontal humano através do RT-PCR sob uma compressão de 25g/cm<sup>2</sup> por 3, 6 e 12h. Após a compressão, o RANKL e NFATC2 foram significativamente regulados para 6h e parcialmente suprimidos pelo KN-93 para o tempo de 12h. A expressão da OPG foi diminuída para o tempo de 3h, e elevada para 6h, significativamente regulada para 12h. Concluíram que a compressão estática aumenta a expressão de OPG nas células do ligamento periodontal pelo menos parcialmente pela via CaMK.

SOKOS et al. (2015) apontam que a formação de osteoclastos no ligamento periodontal humano desempenham um importante e duplo papel na remodelação do osso alveolar. Sob condições fisiológicas, e que este pode sintetizar níveis mais elevados de OPG em comparação com RANKL, que tem um efeito inibitório na osteoclastogênese. Quando o equilíbrio fisiológico é perturbado sob a influência de forças mecânicas ou por infiltrado bacteriano, a produção de moléculas envolvidas na osteoclastogênese aumenta possivelmente

levando a uma maior formação de osteoclastos.

O trabalho de JACOBS, WALTER e ZIEBART (2015) avaliou a influência da força mecânica no ligamento periodontal sob o efeito dos bifosfanatos durante o movimento ortodôntico. As culturas de fibroblastos receberam doses de 5 e 50 um de clodronato e de zoledronato durante 48 horas, e aplicaram uma força de 3cN/mm<sup>2</sup> e 5.2cn/mm<sup>2</sup> por 12horas. Através do PCR avaliou-se a expressão genica do RANKL e da OPG. O estudo concluiu que forças baixas e bifosfanatos contribuem para uma formação óssea.

JACOBS et al. (2013) estimularam células do ligamento periodontal humano com estresse mecânico intermitente por 24 horas. Os resultados mostraram que o estresse mecânico intermitente aumentou dramaticamente a expressão de IGF-1 às 24 h. O pré-tratamento com TGF-  $\beta$  receptor I ou TGF- p um anticorpo pode inibir a mecânica intermitente induzida pelo stress de IGF-1. Este estudo sugeriu que a expressão de IGF-1 quando induzida por um stress mecânico intermitente em células do ligamento periodontal pode ser inibido em condições de hipóxia mímica.

OTERO et al. (2016) publicaram um estudo onde investigaram a expressão e concentração do RANKL e OPG no ligamento periodontal humano quando aplicado diferentes forças ortodônticas. Avaliaram 32 pacientes e por 07 dias aplicaram cargas de magnitude de 4 e 7. Após esse período os dentes foram extraídos e analisaram no ligamento periodontal através do RT-PCR das

moléculas e pelo método ELISA a concentração dos mesmos. Os resultados mostraram diferenças estatísticas na concentração do RANKL no grupo controle com o lado que recebeu carga compressiva e de tensão. A expressão do RANKL aumentou para a carga de 4g. Concluíram que a significância da razão foi consequência do aumento da concentração média de RANKL, sem relação com a diminuição da concentração de OPG.

NETTELHOFF, JACOBS e WALTER et al. (2016) estudaram a influência da compressão mecânica nos fibroblastos e osteoblastos do ligamento periodontal. As células foram expostas as dois tipos de cargas compressivo, 2 cN/mm<sup>2</sup> e 4 cN/mm<sup>2</sup>, por 12 horas. Para coleta dos dados foram utilizados o PCR e o teste ELISA. A compressão causou nos fibroblastos uma resposta expressiva sobre os osteoblastos, tendo um aumento na expressão gênica para as carga maior de 4 cN/mm<sup>2</sup>, entretanto o aumento da carga diminui a expressão de RANKL se comparar com a carga de 2cN/mm<sup>2</sup>. No teste ELISA a síntese de osteopontina foi elevada para a carga de 2cN/mm<sup>2</sup> quando comparado ao grupo controle, mas com o aumento da carga esse efeito foi menor.

CHEN et al. (2018) avaliaram o efeito diferencial da tensão mecânica nas células-tronco em direção aos queratócitos e exploraram os efeitos sinérgicos da tensão mecânica (fator físico) e do meio de indução (fator bioquímico). A estimulação mecânica permitiu uma diferenciação das células do ligamento periodontal em queratinócitos. A expressão de integrinas também foi regulada positivamente após

estimulação mecânica. A combinação do fator mecânico ao meio indutor favoreceu a diferenciação dos queratócitos. As camadas de células foram montadas através do tratamento e induziram o meio, elas tornaram-se transparentes, multilamelares e expressaram marcadores típicos do estroma.

## 2.2 Cultura em 3D

A modulação da interação das moléculas sob uma compressão e a expressão e ativação da OPG, RANK e RANKL que podem ser modulados pela força mecânica , indica uma relação causal entre esse sistema mostrando como a carga estaria influenciando essa resposta biológica quando analisamos um sistema 3D. O sistema de cultura bidimensional vem sendo utilizado para investigar a fisiologia e sua mecânica nesse sistema. Esse sistema é limitado pelo fato de que as células são normalmente embebidas em um complexo extracelular cercado por colágeno, proteoglicanas e proteínas não colágenas; e também essas células estacionadas num sistema bidimensional teriam lacunas quando se pensa em simular interações que acontecem in vivo. ( SAMINATHAN et al., 2013).

O desafio da engenharia tridimensional seria reproduzir um arcabouço de tecido que replique não somente a interação entre as células num sistema 3D , mas que também reproduza as características mecânicas e viscoelásticas .( AHERNE et al., 2015 )

A maneira como essa matriz artificial se porta sob uma pressão contínua simulando in vitro a força dissipada para os tecidos e quais moléculas estariam envolvidas nesse processo seria um caminho para elucidar a viabilidade desse material ( KAWASE et al., 2015 ).

LI et al. (2011) elaboraram um modelo tridimensional com LP humano usando uma folha fina de ácido láctico-co-glicólico que serviu como um arcabouço. Após o aumento da compressão estática de 5 - 35 g/cm<sup>2</sup>, durante 6 horas, a expressão de RNAm de RANKL foi significativamente regulada para cima pela força  $\geq 25$  g/cm<sup>2</sup> no modelo. Depois de ter sido submetido à compressão estática de 25 g/cm<sup>2</sup> para 6 - 72 horas, a expressão de RNAm de PTHrP, IL-11, IL-8, e FGF-2, potenciais indutores de osteoclastogênese, foi significativamente expressiva no modelo, o que foi adicionalmente verificado pela compressão de LP humano in vivo. No entanto, quando fibroblastos gengivais humanos foram substituídos por células LP no modelo, quase nenhum dos indutores de osteoclastogênese foram expressos por forças de compressão. Os resultados forneceram novas evidências de que OPG também é um gene mecanorresponsivo em LP, e sua regulação negativa imediata após a compressão pode contribuir para a indução da osteoclastogênese. Este modelo de tecido pode servir como uma ferramenta eficaz para o estudo da resposta mecânica do ligamento periodontal.

BARRETO et al. (2013) propuseram um novo conceito numérico que



define um modelo de elemento finito 3D multi-estrutural de uma célula aderente para investigar as diferenças biofísicas e bioquímicas do papel mecânico de cada componente do citoesqueleto sob carga. O modelo inclui feixes de actina protendidos e microtúbulos no citoplasma e no núcleo circundados pelo córtex actínico. Foram realizadas simulações numéricas de experimentos de microscopia de força atômica submetendo o modelo de célula a cargas compressivas. O papel numérico dos componentes do citoesqueleto foi corroborado com as medições da força da microscopia de força atômica em células de osteossarcoma U2OS e fibroblastos NIH-3T3 expostos a diferentes drogas disruptoras do citoesqueleto. A simulação computacional mostrou que o córtex de actina e os microtúbulos são os principais componentes visados na resistência à compressão. Esta é uma nova ferramenta numérica que explica o papel específico do córtex e supera a dificuldade de isolar este componente de outras redes. A simulação computacional mostrou que o córtex de actina e os microtúbulos são os principais componentes visados na resistência à compressão. Esta é uma nova ferramenta numérica que explica o papel específico do córtex e supera a dificuldade de isolar este componente de outras redes in vitro . Isso ilustra que uma combinação de estruturas do citoesqueleto com suas

próprias propriedades é necessária para uma descrição completa da mecânica celular.

SAMINATHAN et al., (2013) afirmam que a cultura de células em monocamada não são ideais. Primeiro, pela ausência da estrutura tridimensional de uma construção de tecido e, em segundo lugar, a falta de estímulos biomecânicos fornecidos pela mastigação e outras formas de carga oclusal. Sugerem que os hidrogéis sirvam para criar estruturas de tecido tridimensionais auxiliando o estudo na biologia celular, bioengenharia, medicina regeneradora e regenerativa. Os hidrogéis são uma classe de materiais poliméricos que podem absorver grandes quantidades de água sem se dissolverem, além de imitarem mais de perto o meio ambiente experimentado pelas células in vivo e conferirem efeitos benéficos sobre a expressão gênica, adesão celular, morfologia e fenótipo. Assim eles construíram um modelo tridimensional e cultivaram células do ligamento periodontal em camadas de hidrogel de hialuronano. Avaliaram o número de células e viabilidade por microscopia confocal de varredura a laser. Através do RT-PCR analisaram a expressão de alguns genes como as nucleoproteínas, TIMP-1, CTGF e FGF-2. Os resultados mostraram que as culturas estacionárias cresceram mas valores de quantidade relativa sugerindo efeitos modestos sobre a expressão gênica. Dois fatores de transcrição (RUNX2 e PPAR $\gamma$ ), dois colágenos (COL1A1, COL3A1), quatro MMPs (MMP-1, 2, 3, 13), TGF $\beta$ 1, RANKL, OPG e P4HB foram detectados por eletroforese em gel. Em culturas

mecanicamente ativas, com exceção de P4HB, TGFB1 e RANKL, cada uma foi regulada em algum ponto na escala de tempo. Para a síntese de MMPs e TIMP-1. SOX9, MYOD, SP7, BMP2, BGLAP ou COL2A1 não foram detectados em culturas estacionárias ou mecanicamente ativas. Ao serem encapsulados na matriz HA-gelatina, as células LP permaneceram arredondadas ao longo dos primeiros dias, adquirindo gradualmente um fenótipo fibroblástico e, embora inicialmente distribuídas uniformemente em todo o gel, com crescimento celular, os dois terços centrais dos poços tornaram-se densamente povoados. Um aumento progressivo no número de células em culturas estacionárias ocorreu com e sem a adição de fatores de crescimento, que estabilizaram cerca de 2 semanas. A adição de CTGF e FGF-2 resultou em um aumento significativo no número de células por campo em comparação com os controles.

YI et al., (2015) relatam que a família CAMK contém uma série de proteínas que desempenham papéis críticos na modelagem e remodelação óssea. O uso de micro arranjos para os processos de expressão gênica e destaca como potencial a via CAMK II na resposta mecânica. As células foram colocadas em uma sistema PLGA-3D e cultivadas sob força compressiva estática. A relação entre a expressão de OPG / RANKL foi significativamente regulada para baixo 3 e 6 h após a aplicação da carga, indicando um papel potencial da indução da osteoclastogênese. Por outro lado, a expressão de OPG diminuiu em 3h, enquanto começou a elevar em 6h e foi significativamente regulada para cima após 12h.

No entanto, esta elevação foi grandemente impedida pelo KN-93, um inibidor específico da via CAMK II, sugerindo que a via da CAMK II participa na regulação positiva da OPG induzida pela estimulação por compressão estática a longo prazo. A expressão de NFATC2 foi aumentada pela força compressiva enquanto que parcialmente inibida pelo tratamento com KN-93. Destacam o fato de que a força mastigatória e a força ortodôntica, ambas transmitidas ao osso alveolar através do ligamento periodontal, resultam em efeitos opostos no metabolismo alveolar. Assim, as vias CAMK II podem ser muito mais sensíveis à força mastigatória (intermitente) do que a força ortodôntica (estática).

SHEIKH et al., (2017) em sua revisão de literatura discutem como as células dos tecidos periodontais possuem a capacidade de induzir uma regeneração tecidual quando utiliza-se uma membrana de colágeno e como estas possuem bons resultados quando utilizadas tanto em preenchimento do defeito ósseo como para recobrimento radicular. O raciocínio do uso de membranas de barreira para regeneração guiada de tecidos periodontais é ter uma barreira física biocompatível impedindo o crescimento de células de tecido mole ao redor. Isso permite a proliferação de células angiogênicas e osteogênicas para migrarem para o coágulo sanguíneo no defeito protegido pela membranas, estabilizando os materiais de enxerto. A solução de proteína entra em contato com outra fase, as proteínas têm mais afinidade para se acumular na interface e a molhabilidade da superfície afeta a capacidade de adsorção de proteínas nas membranas de barreira. As proteínas

adsorvidas têm o potencial de atrair fatores de crescimento específicos e células progenitoras que desempenham um papel vital na regeneração e reparação de tecidos. O colágeno é uma proteína fibrosa e pode ser extraído por várias técnicas, tem pouca imunogenicidade, atrai e ativa células de fibroblasto gengival e é hemostático. As membranas de colágeno demonstraram estimular a síntese de DNA de fibroblastos e osteoblastos, e apresentaram maiores níveis de aderência às superfícies da membrana de colágeno em comparação com outras superfícies da membrana. O grau de reticulação das fibras de colágeno afetou a taxa de degradação levando a uma degradação mais lenta. Na revisão, relatam que as membranas de colágeno reticuladas persistem mais do que as membranas de colágeno não reticuladas.

FENG et al., (2017) estudaram o papel da proteína caderina-11 no LP sob estimulação mecânica, e associaram à uma matriz de colágeno. A caderina-11 (codificada pelo gene CDH11) é uma caderina clássica de tipo II que medeia a adesão intercelular entre células do mesmo tipo, o que é crucial para a morfogênese e a arquitetura dos tecidos e é principalmente expressa em células do tipo mesenquimal, como fibroblastos e osteoblastos. O estudo teve como objetivo testar a hipótese de que a caderina-11 é expressa pelas células do ligamento periodontal e que modula a morfologia celular e a síntese de colágeno em resposta ao estresse mecânico. As culturas foram submetidas a intensidade de tensão mecânica variando de 0 a 2 g /cm<sup>2</sup> durante 24 horas ou a 1 g /cm<sup>2</sup> para

diferentes tempos variando de 0 a 24 horas.

As expressões de mRNA e proteína da caderina-11 na células do ligamento periodontal foram suprimidas para os tempos de 4, 8, 12 e 24 horas quando a carga era de intensidade de 1 g /cm<sup>2</sup>. Os resultados sugerem que a caderina-11 é expressa pelas células do ligamento periodontal e que estas respondem ao estresse mecânico. Concluiu-se que o estresse mecânico suprimiu a expressão da proteína e diminuiu a expressão do colágeno que foi diretamente afetado pelo aumento do tempo.

MEHRDAD et al., (2018) relata que a migração dos fibroblastos para a área da ferida é um fenômeno crítico no processo de cicatrização de feridas. Assim nesse estudo os pesquisadores desenvolveram um arcabouço bioativo com liberação controlada de PDGF-BB para induzir a migração de células de fibroblastos de pele primária. Esse sistema tinha nanopartículas de quitosana e tripolifosfato de sódio. A fixação celular e a morfologia de células foram avaliadas usando um microscópio de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura. A relação do aspecto médio das células no sistema contendo nanopartículas de quitosana carregadas com PDGF-BB foi significativamente maior do que o grupo controle. No estudo do RT-PCR analisaram uma expressão gênica significativa no nível de actina, uma proteína que em seres humanos é codificada pelo gene Arp2. A massa celular teve uma proliferação maior em resposta ao sistema com PDGF-BB .

Método

### 3- Método

#### 3.1 Desenho da Pesquisa

Secundário

Retrospectivo

#### 3.2 Amostra ou Casuística

A Pesquisa para a presente revisão de literatura fez-se através do acesso às bases de dados primárias - MEDLINE ( PubMed ) , LILIACS-BIREME e COCHRANE no período de 2008 até 2018 que abordassem os eventos biológicos no ligamento periodontal e osso alveolar associados à aplicação de forças para pesquisas que foram desenvolvidas in vitro.

#### 3.3 Delineamento da Pesquisa

Foram utilizadas combinações com os seguintes termos : (orthodontics forces or osteoclastogenises) and (periodontal ligament or fibroblastos) and mechanical loading

A pesquisa incluiu artigos de revisão e artigos de pesquisas laboratoriais .As



restrições dos artigos foram para os artigos que não estivessem em língua inglesa e para ensaios clínicos *in vivo*.

Estratégia de busca :

((("orthodontics"[MeSH Terms] OR "orthodontics"[All Fields]) AND forces[All Fields]) OR ("osteogenesis"[MeSH Terms] OR "osteogenesis"[All Fields] OR "osteoclastogenesis"[All Fields])) AND (("periodontal ligament"[MeSH Terms] OR ("periodontal"[All Fields] AND "ligament"[All Fields]) OR "periodontal ligament"[All Fields]) OR ("fibroblasts"[MeSH Terms] OR "fibroblasts"[All Fields])) AND (mechanical[All Fields] AND loading[All Fields]) .

### 3.4 Procedimentos

Critérios de inclusão e Exclusão: Os artigos foram selecionados com base na leitura dos títulos e resumos e submetidos a uma leitura minuciosa. Destes foram incluídos todos os que fizessem referência a dados relativos a aplicação de cargas , e eventos biológicos associados ao ligamento periodontal humano e osso alveolar e a expressão molecular envolvida nesse processo. Foram aceitos artigos que aplicaram qualquer tipo de carga , contínua, cíclica, variável . Foram aceitos todos os artigos que avaliaram a expressão de moléculas envolvidas nesse processo, independente de quais fossem.

Foram excluídos : todos os artigos que não tivessem relevância para o tema e que não cumprissem os seguintes requisitos : estudos in vitro , fibroblastos do ligamento periodontal e relacionados a cargas sobre sistemas 3D ou para aplicação de carga diretamente sobre as células.

Foram localizados 66 artigos, 54 selecionados e 12 excluídos.

Alguns outros artigos foram incluídos independente do ano para sustentar técnicas empregadas até os dias atuais e para discussão da revisão.

Excluíram-se os artigos que os trabalhos foram feitos in vivo.

Resultados

#### 4- Resultados

Dos 66 artigos selecionados , foram revisados 54 artigos excluídos 12 artigos.

Dentro desses artigos revisados, 45 artigos realizaram forças compressivas , e dentro desse grupo 15 artigos realizaram essa força em sistemas 3D ; isto é, criaram modelos tridimensionais para cultivar as células e aplicar as cargas sobre estas. Os outros 30 artigos realizaram esse mesmo tipo de força, compressiva, sob um sistema em monocamada; isto é , aplicaram a carga diretamente sobre as células.

Apenas 09 artigos estudaram a força cíclica aplicada sobre o ligamento periodontal, sendo que 07 artigos utilizaram o sistema em monocamada, aplicando a carga diretamente sobre as células e 02 artigos criaram um modelo tridimensional para aplicação da mesma carga.

Abaixo uma tabela com os artigos mais citados e um resumo simplificado do estudo.

Kanzaki 2002	Nishijima 2005	Nakao 2007	Rios 2008	KOOK 2009	Hacopian 2011
RANKL, OPG, COX1, COX2, fosfatase A PGE2	RANKL e OPG	RANKL, OPG e IL-1	Periostin e TGF- $\beta$	RANKL OPG	Col1 Beta actina MMP-1 TIMP-1
Cilindro de vidro :0,5;1;2;3 g/cm <sup>2</sup> 0.5;1.5;6;24 e 48h	Cilindro de vidro 0.5;1;2;3 g/cm <sup>2</sup> 0 a 48h	Cilindros de vidro : contínuo e intermitente 2 ou 5g 2/3 e 4 dias	Tensão cíclica 0 a 20% de deformidade 0 a 48h	Força cíclica	Força Cíclica 0 a 24h
Fosfatase alcalina pico para 2g em 24h RANKL aumentou com aumento da carga	Aumento de RANKL dependente do tempo, pico em 24h Diminuição de OPG de 0 a 3 g.	OPG diminuiu com o aumento da força RANKL teve pico para 5g	Apos 14% periostina teve pico 48h TGF- $\beta$ aumentou com o aumento da carga	RANKL e OPG inalterados nos fibroblastos quando tratados com dexametasona e vitamina D	COL 1 teve uma expressão 1,4 maior para 30min, MMP-1 também teve expressão 1,5 maior que o grupo controle para 30mi 3 60min

Nokhbehsaim 2012	Romer 2013	Jacobs 2015	Li 2016	Yi 2015	Nakajima 2008
Inflamação das células estimuladas com interleucina	Fibromodulina, periostina, OPG, RANKL, Runx2 e fosfatase alcalina	RANK, OPG, Actina	RANKL, OPG, COX-2, PTHrP, IL-11 e	RANK, OPG, NFATC2, GAPDH	RANK OPG Fator de crescimento actina
Tensão cíclica com 0,3 e 20% bioflex	Cilindro de vidro de 2g ( kanzaki ) por 24h	Bioflex para gerar tensão	Cilindro de vidro 0,5,15,25g tempo:6,24 e 72	Cilindro de vidro 25g	Cilindro de vidro 0,5/1/2/3/4 por 24h
A IL-6 aumentou em células tratadas para inflamação	A força aumentou COX2 em 5 vezes e para o grupo com bactéria	A expressão de OPG aumentou no grupo bifosfanato	RANKL teve pico para 6h : nas cargas de 25,15 e 5	OPG teve decréscimo depois de 3h e após 12h aumento	Fator de crescimento foi aumentado para todas as cargas em todos os tempos

Discussão

## 5- Discussão

A presente revisão mostrou estudos com diferentes técnicas laboratoriais para avaliar as respostas biológicas de fibroblastos do ligamento periodontal quando estes fossem submetidos a modelos experimentais que transmitissem cargas sobre o sistema . Os estudos variam de muitas maneiras , entre elas destacam-se os tipos de modelo de carga aplicada : cíclica ou estática e os tipos de cultura dos fibroblastos : monocamadas ou sistemas tridimensionais. Como variáveis temos o tempo que se aplicou a carga e a magnitude dessa mesma.

Os sistemas tridimensionais permitem uma variação da sua arquitetura com porosidades que permitem a organização estrutural e conferem funcionalidade biomolecular ( Lu et al., 2010 ). Esse sistema conseguiria otimizar a distribuição das células e avaliar de forma mais próxima o sistema ósseo, ligamento periodontal e o cimento. Os arcabouços multifásicos restabelecem a relação da estrutura e estaria mimetizando o tecido estudado de forma mais fiel e analisando os pontos mais críticos dessa estrutura ( Dormer et al., 2010). Assim , um suporte rígido, porém poroso adequado suportaria uma carga fisiológica e poderia reproduzir tecidos de interesse para os estudos.

Como opções para a confecção do arcabouço para mimetizar o ligamento periodontal humano destacam-se os polímeros biodegradáveis e os biopolímeros naturais ( Frenkel et al., 2005 , Wang et al., 2010) . Na presente revisão o tipo de arcabouço mais utilizado para simular *in vitro* o ligamento periodontal foram os

de colágenos porosos ( Kon et al 2010) e os a base de hidrogel ( Chen et al., 2011 ).

Os sistemas tridimensionais conferem uma adesão forte entre as células e o meio garantindo a dissipação das cargas de forma mais homogênea, rodeando toda a estrutura celular . Assim acredita-se que esse sistema garante a viabilidade celular e assegura a integridade do sistema ( Jeon et al 2014).

O estudo de Jianru et al em 2014 mostra que quando as células do ligamento periodontal são cultivadas sob uma matriz de polímero poli-L-glicólico e ácido poli-L-lático e colocadas sob uma força de compressão a relação entre a OPG e RANKL é significativamente diminuída para os tempos de 3 e 6 horas, indicando um potencial indução da osteoclastogênese . A expressão da OPG diminui após 3 horas e começa a elevar para o tempo de 6 horas e é significativamente expressiva após o tempo de 12 horas. A regulação da osteoprotegerina indica uma supressão para a reabsorção óssea. Nesse estudo o aumento da OPG foi regulado pelo KN-93 , um inibidor específico da via CAMK II , sugerindo que essa via participa na regulação positiva da OPG e é induzida pela compressão estática.

Esse estudo está de acordo com outros estudos como os de Li 2016 e Yi 2015 que também utilizaram sistemas tridimensionais e acreditam que esse tipo de arcabouço regula e expressão de determinadas moléculas e induzem respostas diferentes dos sistemas monocamadas; por permitirem um contato entre células de maneira diferente e que portanto promoveriam respostas diferentes.



Kanzaki 2002 e Li 2011 demonstraram que o aumento da expressão de RANKL nas células do ligamento periodontal quando estes são submetidos a força compressiva promoveria a formação de osteoclastos e conseqüentemente a movimentação dentária.

Bloemen et al em 2010 acredita que o contato direto célula-célula criaria um ambiente favorável para a ligação do RANK-RANKL , evitando a interação da OPG com RANKL induzindo osteoclastos.

Nishijima et al., em 2006 em um sistema de monocamadas 2D relata a expressão de OPG reduzida ou inalterada nas células do ligamento periodontal quando submetidos a compressão, em contraste o estudo de Jianru et al., em 2014 que através de uma cultura 3D relata a expressão de OPG significativamente aumentada e regulada após estímulos mecânicos . O aumento mais demorado da OPG poderia explicar a formação óssea que se inicia após a pressão , fato que previne a perda óssea alveolar e permite que movimentações dentárias sejam feitas .

As principais vantagens do sistema 2D de cultura celular é o controle do ambiente , avaliação do crescimento celular e contagem de células se comparado ao sistema 3D. A maioria das culturas monocamadas dependem da adesão celular .

Os sistemas em monocamadas parecem serem sistemas seguros de avaliação

quando comparados entre eles ; entretanto quando os estudos usam arcabouços para confecção de sistemas tridimensionais as respostas desse modelo muitas vezes não vai de encontro com o sistema monocamadas, sugerindo a necessidade de mais estudos que avaliem um modelo laboratorial confiável e reprodutível e dependente da célula a ser estudada.

Quando realizamos uma movimentação ortodôntica podemos ter como movimentos o torque, extrusão e intrusão dentária, e estes movimentos estão diretamente relacionados a magnitude da força , posição e das estruturas adjacentes ( NAKANO et al., 2004 ).

Di Domenico et al. em 2012 mostra que as maiores forças ortodônticas geram elevadas tensões que podem promover a necrose tecidual , e movimentação dentária estaria causando uma reabsorção óssea; e quando temos menores forças ortodônticas não associam necrose tecidual nesse tecido. A carga ideal permitiria uma reabsorção do osso alveolar seguido de uma acomodação tecidual e remodelação garantindo a integridade do sistema.

Casa et al (2006 ) afirma que quando temos a reabsorção óssea alveolar numa área que está sofrendo compressão , temos atividade dos osteoblastos e osteoclastos. Nesse evento temos a solubilização de minerais e a degradação da matriz .

Lee et al.,(2009) investigaram o efeito desse estresse quando aplicou-se uma força

de tensão de cisalhamento em culturas em monocamadas de condrócitos osteoatríticos humanos. Os padrões de expressão gênica após estresse de cisalhamento mostram alta similaridade com a expressão gênica no processo reparativo de condrócitos; o estudo concluiu que a análise de microarranjo sugere uma interação próxima entre o estresse de cisalhamento e a patogênese da osteoartrite. Então eles acreditam que isso é devido ao tipo de força empregada no estudo, em conjunto com o sistema 2D.

Wang et al., (2013) investigou se microRNA 208 é um regulador crítico na hipertrofia de cardiomiócitos sob um estiramento mecânico. O alongamento mecânico aumentou significativamente a expressão dessa molécula e a expressão da proteína hipertrofica dos cardiomiócitos ; concluindo que o alongamento cíclico aumenta a expressão de proteínas.

Li et al.,(2014) em sistema de monocamadas mostram que o ligamento periodontal em um ambiente hipóxico , sob condições de periodontite ou estresse físico regula as alterações responsivas ao estresse cíclico na proliferação e diferenciação osteogênica das células do ligamento periodontal e que esse modelo poderia servir como um modelo seguro para se estudar os mecanismos da periodontite.

Jacobs et al.,(2013) mostrou pela primeira vez que fibroblastos cultivados em monocamadas que receberam carga de tração sob efeito dos bisfosfanatos são dependentes da magnitude da carga quando se estuda a viabilidade , taxa de

apoptose e sistema OPG/RANKL .As baixas forças e bifosfanatos aumentam os fatores de aposição óssea, enquanto que forças altas combinadas com bifosfanato estimulam a osteoclastogênese.

Lee em 2004 mostra que a frequência e duração dos sinais mecânicos são características importantes que podem influenciar a resposta biológica a força aplicada.

Esses estudo de Lee 2004 , Lee 2009, Wang 2013, Li 2014 e Jacobs 2013, caracterizam seus resultados dependentes do tipo de força aplicada e suas variáveis com magnitude e tempo como grandes responsáveis pelas suas respostas e não pelo tipo de cultura desenvolvida.

Quando os estudos avaliam a força mecânica contínua , mede-se a tensão que estaria envolvendo as células que interagem com o ambiente extracelular e estuda-se as modificações que ocorrem na fisiologia celular através da expressão de determinadas proteínas. Os componentes do citoesqueleto podem ter funções mecânicas distintas na célula (BARRETO et al., 2013) ; e como resposta às forças aplicadas, esse citoesqueleto pode se estruturar e resistir a deformação adicional e se reorganizar para manter uma vitalidade celular (FLETCHER et al., 2010).

A matriz recebe uma carga que induz um agrupamento de integrinas e a ativação dessas regulando a via de sinalização intracelular associada à proliferação celular. Essas são mecanosensores celulares e podem desencadear sinais que alteram a

expressão gênica (ANSELME et al., 2010).

Myokai et al. em 2003 afirma que ainda não está claro o quanto as células distendem aos diferentes tipos de estimulação mecânica. Wescott et al em 2007 avaliaram o efeito da deformação no fibroblastos cultivados e submeteram esses a diferentes alongamentos através de tensão Flexercell.

O estresse de cisalhamento pode surgir durante a tração e compressão. Isso provavelmente por causa da estrutura fibrosa do tecido conjuntivo e pela superfície irregular do osso alveolar ( Nakao et al., 2007).

Brown em 2000 mostra que a centrifugação é usada para estimular mecanicamente e aplica uma tensão de cisalhamento de fluidos aos frascos de cultura celular. Afirma que o dano celular é uma questão importante no estudo da resposta celular às cargas mecânicas aplicadas, e que se deve medir a viabilidade celular em todas as condições. As faixas de forças apropriadas são escolhidas numa faixa de 90% de viabilidade celular e o teste mais utilizado é de exclusão de corante azul tripan.<sup>10</sup>

No estudo Howard 1998 mostra um aumento do colágeno tipo I nos fibroblastos expostos a deformidade biaxial intermitente ao passo que no estudo Hacopian 2011 não houve alterações na expressão de colágeno tipo I por forças mecânicas interrompidas; provavelmente se deve aos diferentes tipos de forças aplicadas as células. O estudo considerou as forças intermitentes mais adequadas para a movimentação ortodôntica porque o tecido periodontal pode se reparar após um

período de reparação tecidual. No estudo de Howard 1998 as forças de tração contínua e cíclica causaram um aumento estatisticamente significativo na produção de colagenase , mas a quantidade foi maior quando as células estavam sob cíclicas.

Alguns estudos levantam questões se a força cíclica não poderia induzir uma taxa de apoptose maior do que outros tipos de sistemas de carga. Assim , como sugestão para a diminuição desse risco Robbling et al em 2001 relatam que algumas horas são necessárias para que as células restaurem a sua mecanossensibilidade. Nesse estudo eles mostram uma regulação positiva de colagenase tipo I e MMP-1 após a estimulação dos fibroblastos com a força contínua centrífuga. Nesse sistema as células são menos sensíveis a força aplicada no início do ciclo seguinte, porque o mecanismo estimulante diminui após os períodos de descanso que existem entre as ativações.

Chiba em 2004 mostrou que a mudança na orientação dos microtúbulos das células do ligamento periodontal humano em resposta ao alongamento cíclico, poderia representar um mecanismo de autoproteção.

A força cíclica parece ser um modelo de estímulo confiável e reproduzível, pois possui estudos que mostram que esse tipo de força transmitiria ao meio celular situações mais próximas do que acontece na fisiologia celular *in vivo* , mas existe a necessidade de se avaliar sempre a vitalidade celular, por se tratar se um mecanismo que pode gerar altas taxas de apoptose dependendo do tipo celular a

ser estudiado.

CONCLUSÃO



## 6- Conclusão

Concluiu-se que força compressiva intermitente estimula a reabsorção óssea no tratamento ortodôntico. No entanto deve-se evitar a alta força compressiva na ortodontia para evitar danos aos tecidos, enquanto a força compressiva moderada possibilita a remodelação tecidual ativa e a movimentação dentária. As forças cíclicas induzem uma apoptose celular com carga menores se comparados aos estudos com força compressiva.

Tantos os estudos em monocamadas como em sistemas 3D parecem reproduzir *in vitro* a fisiologia dos tecidos estudados, mas isso está diretamente relacionado ao tipo de célula a ser estudado e o que irá ser avaliado no sistema.

Referência

## 7- Referências

Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, Foster RA, Somerman MJ. Human Periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J Periodontol.* 1991; 62: 499-503.

Anselme K, Ponche A, Bigerelle M. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: biological aspects. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Journal of Engineering in Medicine.* 2010; 224(12);1487–1507

Aherne M, Yang Y, El Haj AJ, Then KY, Liu K-K. Characterizing the viscoelastic properties of thin hydrogel-based constructs for tissue engineering applications. *J R Soc Interface.* 2005;2;455-463

Araujo AS, Fernandes AB, Maciel JV, Netto JN, Bolognese AM. New methodology for evaluating osteoclastic activity induced by orthodontic load. *J appl Oral Sci.* 2015; 23(1); 19-25

Barreto S, Clausen CH, Perrault CH et al. A multi-structural single cell model of force-induced interactions of cytoskeletal components. *Biomaterials.* 2013 Aug; 34(26);6119–26

Batista ML, Lopes RD, Seelaender MC, Lopes AC. Anti-inflammatory effect of physical training in heart failure: role of TNF-alpha and IL-10. *Arq Bras Cardiol.* 2009 Dec;93(6);643-51

Bloemem V, Schoenmaker T, De Vries T, Everts V. Direct cell-cell contact

between periodontal ligament fibroblasts and osteoclast precursors. *J Cell Physiol.* 2009; 222;565-73

Brown TD. Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro : a review. *J Biomech.* 2000; 33; 3-14

Casa MA, Faltin RM, Faltin K, Arana-Chavez VE. Root resorption on torqued human premolars shown by tartrate-resistant acid phosphatase histochemistry and transmission electron microscopy. *Angle Orthodontist.* 2006;76(6);1015–21

Chen CS .Mechanotransduction- a field pulling together .*Journal of Cell Science* 2008; 121(20); 3285-92

Chen J, Chen H, Li P , Diao H, Zhu S, Dong L, et al. Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone in vivo using MSCs induced by a spatially controlled gene system in bilayered integrated scaffolds. *Biomaterials.* 2011; 32; 4793-4805.

Chen J, Zhang W, Backman LJ, Kelk P, Danielson P. Mechanical stress potentiates the differentiation of periodontal ligament stem cells into keratocytes. *Br J Ophthalmol.* 2018; 0;1–8

Chiba M, Mitani H. Cytoskeletal changes and system of regulation of alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament cells induced by mechanical stress. *Cell Biochem Funct.* 2004;22(4);249-56

Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M et al. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteo- protegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2003;38;380–7

De Vries TJ, Schoenmaker T, Wattanaroonwong N et al. Gingival fibroblasts are better at inhibiting osteoclast formation than periodontal ligament fibroblasts. *J Cell Biochem.* 2006; 98;370-382

Di Domenico M, D'Apuzzo F, Feola A et al. Cytokines and VEGF induction in orthodontic movement in animal models. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.*2012;12;2012-14

Diercke K, Sen S, Kohl A, Lux CJ and Erber R. Compression-depend Up-regulation of Ephrin-A2 in PDL Fibroblasts attenuates osteogenesis. *J Dent Res.*2011; 90(9);1108-15

Drasdo D, Hoehme S. Modelling the impact of granular embedding media, and pulling versus pushing cells on growing cell clones. *New Journal of Physics.* 2012; 14;1–37

Dormer NH, Berkland CJ, Detamore MS. Emerging techniques in stratified designs and continuous gradients for tissue engineering of interfaces. *AnnBiomedEng.* 2010; 38; 2121-41

Feng L, Zhang Y, Kou X, Yang R, Liu D, Wang X, Song Y, Cao H, He D, Gan Y, Zhou Y. Cadherin-11 modulates cell morphology and collagen synthesis in periodontal ligament cells under mechanical stress. *Angle Orthod.*2017; 87(2); 193-99

Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature.*2010; 463(7280);485–92

Frenkel SR , Bradica G, Brekke JH, Goldman SM, Ieska K, Issack O, et al. Regeneration of articular cartilage-evaluation of osteochondral defect. Repair in the rabbit using multiphasic implants. *Osteoarthritis Cartilage*.2005; 13;798-807

Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol* .2003;163; 2021–31

Hacopian N, Hosseinzadeh-Nik T, Ghahremani MH, Rahimi HR, Ostad SN. Effects of continuous and interrupted forces on gene transcription in periodontal ligament cells in vitro. *Acta Medica Iranica*. 2011; 10;643-9

Henneman S, Von den Hoff JW, Maltha JC. Mechanobiology of tooth movement. *European Journal of Orthodontics*. 2008;30(3);299–306

Howar PS, Kucich U, Taliwal R, Korostoff JM. Mechanical forces alter extracellular matrix synthesis by human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res*.1998;33,8; 500-8

Jacobs C, Grimm S, Ziebart T, Walter C, Wehrbein H. Osteogenic differentiation of periodontal fibroblasts is dependent on the strength of mechanical strain. *Arch Oral Biol*. 2013; 58; 896-904

Jacobs C, Walter C, Ziebart T, Dirks I , Schramm S , Grimm S, Krieger E, Wehrbein H. Mechanical loading influences the effects of bisphosphonates on human periodontal ligament fibroblasts. *Clin Oral Invest* .2015; 19; 699-708

Jeon JE, Vaquette C, Theodoropoulos C, Klein TJ, Hutmacher DW. Multiphasic

Construct studied in an ectopic osteochondral defect. Model. J R Soc Interface.2014; 11; 2014-18

Jianru YI, Le LI, Yan YA et al. Static compression regulates OPG expression in periodontal ligament cells via the CAMK II pathway. J Appl Oral Sci. 2015;23(6);549-54

Kawase T1, Kamiya M, Kobayashi M, Tanaka T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. The heat-compression technique for the conversion of platelet-rich fibrin preparation to a barrier membrane with a reduced rate of biodegradation. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2015 May;103(4);825-31

Kawaguchi H, Chikazu D, Nakamura K, Kumegawa M, Hakeda Y. Direct and indirect actions of fibroblast growth factor 2 on osteoclastic bone resorption in cultures. J Bone Miner Res 2000;15;466–473

Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under stress induce osteoclastogenesis by Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. J Bone Miner Res. 2002; 17; 210–2

Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. Endocr Rev.2008 ;29;155–192

Kook SH, Son YO, Hwang JM, Kim FM, Lee CB, Jeon YM, Kim JG, Lee JC. Mechanical force inhibits osteoclastogenic potential of human periodontal ligament fibroblasts through OPG production and ERK-mediated signaling. . J Cell Biochem. 2009; 106; 1001-19

Kook SH, Jang YS, Lee JC. Human Periodontal Ligament Fibroblasts Stimulate osteoclastogenesis in response to compression force through TNF- $\alpha$  Mediated activation of CD4<sup>+</sup>T cells. *J of Cel Biochemistry*. 2011; 112; 2891-2901

Kon E, Delcogliano M, Filardo G, Fini M, Giarvaresi G, Francioli S et al. Orderly osteochondral regeneration in a sheep model using a novel nano-composite multilayered biomaterial. *J Orthop Res*.2010; 28; 116-24

Krishnan V, Davidovitch Z. On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research*. 2009;88(7);597–608

Lee YH, Nahm DS, Jung YK et al. Differential gene expression of periodontal ligament cells after loading of static compressive force. *J Periodontol*. 2007;78(3):446-52

Lee MS, Sun M-T, Pang S-T et al. Evaluation of differentially expressed genes by shear stress in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Chang Gung Medical Journal*. 2009;32(1);42–50

Li Y, Zheng W, Liu JS, Wang J, Yang P, Li ML, Zhao ZH . Expression of osteoclastogenesis inducers in a tissue model of peri- odontal ligament under compression. *J Dent Res*.2011; 90;115–120

Li L, Han M-X, Li S et al. Hypoxia regulates the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells under cyclic tensile stress via mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of Periodontology*. 2014;85(3);498-508

Liang Y.,Sheikh F.Scaffold proteins regulating extracelular regulated kinase



function in cardiac hypertrophy and disease. *Frontiers in Pharmacology*. 2016; 37;1-8

Lisboa RA, Lisboa FA, Santos GC , Andrade VM, Melo JRC. Matrix metalloproteinase 2 activity decreases in human periodontal ligament fibroblast cultures submitted to simulated orthodontic force. *In Vitro Cell Dev Biol-animal* 2009; 45; 614-21.

Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med* 2003;11;17–21

Li L, Han M-X, Li S et al. Hypoxia regulates the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells under cyclic tensile stress via mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of Periodontology*. 2014;85(3);498-508

Lossdorfer S, Gotz W, Jager A .PTH(1-34)-induced changes in RANKL and OPG expression by human PDL cells modify osteoclast biology in a co-culture model with RAW 264.7 cells. *Clin Oral Investig*. 2011;15;941–952

Lu HH, Subramony SD, Boushell MK, Zhang X. Tissue Engineering strategies for the regeneration of orthopedic interfaces. *Ann Biomed Eng*. 2010; 38; 2142-54

Mehrdad P, Saeid V, Abdollah MS, Simzar H and Abdolreza A. In vitro fibroblast migration by sustained release of PDGF-BB loaded in chitosan nanoparticles incorporated in electrospun nanofibers for wound dressing applications .*Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology* .2018; 1-10

Meikle MC .The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. Eur J Orthod.2006; 28;221–240

Mitsubishi M, Yamaguchi M, Kojima T , Nakajima R, Kasai K. Effects of HSP70 on the compression force-induced TNF and RANKL expression. In human periodontal ligament cells.Inflamm. Res. 2011; 60;187-94

Moraes AM, Augusto EFP , Castilho LR. Tecnologia do cultivo de células animais : de biofármacos a terapia gênica. São Paulo : Rocca, 2007 . 503p

Myokai F, Oyama M, Nishimura F, Ohira T, Yamamoto T, Arai H, Takashiba S, Murayama Y. Unique genes induced by mechanical stress in periodontal ligament cells. J Periodontal Res 2003;38(3);255-61

Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanaka Y. Induction of RANKL expression and osteoclast maturation by the binding of fibroblast growth factor 2 to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts. Arthritis Rheum 2004;50;2450–2458

Nakajima R, Yamaguchi M, Kojima T et al. Effects of compression force on fibroblast growth factor-2 and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand production by periodontal ligament cells in vitro. J Periodont Res 2008; 43; 168–173

Nakao K , Goto T, Gunjigake KK. Intermittent force induces high RANKL expression in human periodontal ligament cells. J Dent Res. 2007 Jul;86(7);623-8

Nettelhoff L , Grimm S , Jacobs C , Walter C , Goldschmitt P and Wehrbein H. Influence of mechanical compression on human periodontal ligament fibroblasts and osteoblasts. *Clin Oral Invest.* 2016 ; 20;621–29

Nishijima Y, Yamaguchi H, Kojima T. Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells in vitro. *Orthod Craniofac Res.* 2006 May;9(2);63-70

Nokhbehsaim M, Deschner B , Winter J , Bourauel C , Jager A , Jepsen S, Deschner J. Anti-inflammatory effects of EMD in the presence of biomechanical loading and interleukin-1b in vitro. *Clin Oral Invest.* 2012; 16;275-83

Nukaga J, Kobayashi M, Shinki T, Song H, Takada T, Takiguchi T et al .Regulatory effects of interleukin-1beta and prostaglandin E2 on expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in human periodontal ligament cells. *J Periodontol* .2004 ; 75;249–259

Otero L , Garcia DA , Buitrago LW. Expression and presence of OPG and RANKL mRNA and Protein in human periodontal ligament with orthodontic force. *Gene regulation and Systems Biology* .2016; 10;15-20

Passarella S, de Bari L, Valenti D, Pizzuto R, Paventi G, Atlante A. Mitochondria and l-lactate metabolism. *FEBS Letters.* 2008;582; 3569–76

Robling AG, Burr DB, Turner CH. Recovery periods restore mechanosensitivity to dynamically loaded bone. *J Exp Biol* 2001;204(19);3389-99

Romer P .The molecular mechanism behind bone remodelling: A review. Clin Oral Investig.2009; 13;355–362

Romer P, Kostler J, Koretsi V , Proff P. Endotoxins potentiate COX-2 and RANKL expression in compressed PDL cells .Clin Oral Invest 2013 ;17;2041–48

Rubin CT, Lanyon LE. Regulation of bone formation by applied dynamic loads. J Bone Joint Surg Am. 1984;66(3); 397-402

Saminathan A., Vinoth K.J. , Low H.H., Cao T., Meikle M.C..Engineering three-dimensional constructs of the periodontal ligament in hyaluronan-gelatin hydrogel films and a mechanically active environment.J Periodont Res. 2013; 48;790-801

Sanuki R, Shionome C, Kuwabara A, Mitsui N, Koyama Y, Suzuki N, Zhang F, Shimizu N, Maeno M .Compressive force induces osteoclast differentiation via prostaglandin E2 production in MC3T3-E1 cells. Connect Tissue Res.2010; 51;150–58

Scheres N, Laine ML, Sipos PM et al.Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients are more active in interaction with Porphyromonas gingivalis. J Periodontal Res. 2011; 46;407-16

Sheikh Z, Qureshi J, Alshahrani AM, Nassar H, Ikeda Y, Glogauer M, Ganss B. Collagen based barrier membranes for periodontal guided bone regeneration applications. Odontology. 2017; 105(1); 1-12

Sokos D, Everts V, Vries TJ. Role of periodontal ligament fibroblasts in osteoclastogenesis : a review. J Periodont Res. 2015; 50; 152-59

Ueda M, Sumi Y, Mizuno H, Honda M, Oda T. Tissue engineering: applications for maxillofacial surgery. *Mater. Sci. Eng.* 2000; 13; 7-14

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95;3597–3602

Yamamoto T, Kita M, Yamamoto K, Akamatsu Y, Oseko F, Kanamura N. Mechanical stress enhances production of cytokines in human periodontal ligament cells induced by *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Oral Biol.* 2011;56;251–57

YI J, LI M, Yang Y, Zheng W, LI Y, Zhao Z. Static compression regulates OPG expression in periodontal ligament cells via the CAMK II pathway. *J appl Oral Sci.* 2015; 23(6);543-54

Yu Y, Mu J, Fan Z et al. Insulin-like growth factor 1 enhances the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via ERK and JNK MAPK pathways. *Histochemistry and Cell Biology.* 2012;137(4);513–25

Wang B-W, Wu G-J, Cheng W-P, Shyu K-G. Mechanical stretch via transforming growth factor- $\beta$ 1 activates microRNA-208a to regulate hypertrophy in cultured rat cardiac myocytes. *Journal of the Formosan Medical Association.* 2013;112(10);635–43

Wang W, Li B, Yang J, Xin L, Li Y, Yin H, et al. The restoration of full-thickness cartilage defects with BMSCs and TGF-beta 1 loaded PLGA/fibrin gel

constructs. *Biomaterials*.2010; 31;8964-73

Wescott DC, Pinkerton MN, Gaffey BJ, Beggs KT, Milne TJ, Meikle MC.  
Osteogenic gene expression by human peri- odontal ligament cells under cyclic  
tension. *J Dent Res*.2007; 86;1212–20

Zacchi V, Soranzo C, Cortivo R, Radice M, Brun P, Abatangelo G. In vitro  
engineering of human skin-like tissue. *J. Biomed. Mater. Res*. 1998; 40;187-94

