MARA RUBIA MARQUES

**INTEGRINAS LIGANTES DO PEPTÍDEO RGD ATUAM COMO
MECANOTRANSDUTORES NA CARTILAGEM DO CÔNDILO
MANDIBULAR DE RATOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO
ORTOPÉDICO FUNCIONAL**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Doutor
em Ciências.

São Paulo

2007

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Marques, Mara Rubia.

Integrinas ligantes do peptídeo RGD atuam como mecanotransdutores na cartilagem do côndilo mandibular de ratos submetidos a tratamento ortopédico funcional / Mara Rubia Marques. - São Paulo, 2007.

Orientador: Marinilce Fagundes dos Santos.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia da Movimentação Celular.

Versão do título para o inglês: RGD-binding integrins participate in mechanotransduction in the mandibular condylar cartilage of rats submitted to functional orthopaedic treatment .

Descritores: 1. Integrinas 2. Cartilagem 3. Fibronectina 4. Fator de crescimento 5. Proliferação celular 6. Ortopedia funcional dos maxilares I. Santos, Marinilce Fagundes dos II. Universidade São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual. III. Título.

ICB/SBIB070/2007

MARA RUBIA MARQUES

**INTEGRINAS LIGANTES DO PEPTÍDEO RGD ATUAM COMO
MECANOTRANSDUTORES NA CARTILAGEM DO CÔNDILO
MANDIBULAR DE RATOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO
ORTOPÉDICO FUNCIONAL**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Doutor
em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e
do desenvolvimento

Orientadora: Profa. Dra. Marinilce
Fagundes dos Santos

**São Paulo
2007**

RESUMO

Marques MR. Integrinas ligantes do peptídeo RGD atuam como mecanotransdutores na cartilagem do côndilo mandibular de ratos submetidos a tratamento ortopédico funcional [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

O aparelho propulsor da mandíbula é amplamente utilizado na odontologia a fim de corrigir discrepâncias de crescimento entre mandíbula e maxila. Ele modula o crescimento da cartilagem do côndilo mandibular pela ação de forças indiretas geradas por mudanças de postura da musculatura orofacial. Este trabalho visa contribuir para o esclarecimento das bases moleculares envolvidas nessa terapia, avaliando a participação de integrinas ligantes de fibronectina na transdução das forças mecânicas geradas pelo aparelho propulsor da mandíbula. Análises imuno-histoquímicas mostraram que, *in vivo*, a utilização do aparelho em diferentes períodos, que variaram de 3 a 35 dias, modulou a expressão das subunidades de integrinas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ (ligantes de colágeno) e $\alpha 5$ e αv (ligantes de fibronectina) assim como a proliferação celular. Por meio de imuno-histoquímica e PCR em tempo real se demonstrou que a expressão de fibronectina também foi modulada pelo aparelho de forma positiva. *In vitro*, a aplicação de forças distensivas cíclicas em cultura primária de células da cartilagem condilar aumentou a expressão de mRNA para fibronectina, fatores de crescimento *Insulin-like Growth Factor-I* e *II* (IGF-I e IGF-II) e PCNA, um marcador de proliferação celular. A adição do peptídeo GRGDSP, que bloqueia a ligação de algumas integrinas à matriz extracelular, impediu o aumento na expressão de fibronectina, IGF-I e a proliferação celular, mas não interferiu na expressão de IGF-II. Esses resultados sugerem que as forças geradas pelo aparelho propulsor da mandíbula modulam o crescimento da cartilagem condilar de ratos.

Adicionalmente, integrinas ligantes da sequência RGD desempenham um papel importante na mecano-transdução, levando à expressão de fibronectina, IGF-I e proliferação celular. Desta forma, este estudo contribui para o esclarecimento dos mecanismos pelos quais os aparelhos ortopédicos funcionais estimulam o crescimento e adaptação da cartilagem do côndilo mandibular.

Palavras-chave: Integrinas. Cartilagem. Fibronectina. Fator de crescimento. Proliferação celular. Ortopedia funcional dos maxilares. Mandíbula.

ABSTRACT

Marques MR. RGD-binding integrins participate in mechanotransduction in the mandibular condylar cartilage of rats submitted to functional orthopaedic treatment [Ph. D. Thesis]. São Paulo: Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo; 2007.

Mandibular propulsor appliances are widely used in dentistry in order to correct growth discrepancies between the maxilla and the mandible. The appliance modulates the growth of the mandibular condylar cartilage indirectly, by stimulating postural alterations in the orofacial musculature. The aim of this study was to examine some molecular mechanisms involved in this therapy, particularly the role of fibronectin-binding integrins on transduction of mechanical forces generated by the mandibular appliance. Immunohistochemical analyses demonstrated that, *in vivo*, the use of the appliance for different periods of time (from 3 to 35 days) modulated the expression of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ integrin subunits (collagen-binding), $\alpha 5$ and αv subunits (fibronectin-binding), as well as cellular proliferation. By immunohistochemistry and real time PCR it was shown that fibronectin expression was also up regulated by the use of the appliance. *In vitro*, cyclic distension of condylar cartilage-derived cells increased fibronectin mRNA, as well as *Insulin-like Growth Factor-I* and *II* (IGF-I and IGF-II) mRNA and PCNA mRNA (a cell proliferation marker). The GRGDSP peptide, which competes with some extracellular matrix molecules for integrins, blocked the increase in fibronectin, IGF-I and PCNA mRNA, but did not interfere with IGF-II mRNA expression. These results suggest that forces generated by the mandibular propulsor appliance modulate the growth of the rat condylar cartilage, and that RGD-binding integrins participate in mechanotransduction, leading to an increase in

fibronectin, IGF-I and PCNA expression. In conclusion, this study contributes to clarify the molecular mechanisms involved in growth and adaptation of the mandibular condylar cartilage promoted by functional orthopedic therapy.

Keywords: Integrins. Cartilage. Fibronectin. Growth factor. Cell proliferation. Maxillary functional orthopaedics. Mandible.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Ortopedia Funcional dos Maxilares

A ortopedia funcional dos maxilares é uma especialidade da odontologia que emprega o uso de aparelhos ortopédicos a fim de corrigir discrepâncias de crescimento ântero-posterior entre os maxilares, reposicionando a mandíbula em relação à maxila. Esta terapia procura alterar a tonicidade da musculatura associada à arcada dentária, freqüentemente alterando a posição da mandíbula, da língua ou da musculatura peribucal, com base na hipótese de que os dentes desalinham-se ou, os ossos deformam-se, por um desequilíbrio de função dos músculos da mastigação, da fonação, da postura e até da respiração (Martins *et al.*, 1996). Adicionalmente, a fim de restaurar o equilíbrio entre os maxilares, os aparelhos ortopédicos geram tensões na musculatura orofacial, que são transferidas de forma indireta para a cartilagem do côndilo mandibular, modulando, assim, o seu crescimento (McNamara, 1973, Copray *et al.*, 1988).

A modulação do crescimento mandibular por meio da aplicação de forças mecânicas tem sido alvo de inúmeros estudos durante os últimos anos, principalmente com a finalidade de corrigir as discrepâncias ósseas entre os maxilares. Estas discrepâncias são freqüentes na população e, além das implicações estéticas, ocasionam maloclusões com graus variados de severidade que, quando não corrigidas, podem gerar sobrecarga na articulação têmporo-mandibular (ATM) e ocasionar patologias articulares dolorosas, com comprometimento funcional.

A ATM é uma articulação bilateral, do tipo diartrose, entre o côndilo da mandíbula e a cavidade glenóide do osso temporal. É classificada como uma articulação sinovial que,

além de abertura e fechamento, pode realizar movimentos mais complexos como protrusão, retrusão e lateralidade, isoladamente ou em associação. Suas superfícies articulares são separadas por um disco articular formado por tecido conjuntivo denso com fibroblastos, alguns fibrocondrócitos e poucas células indiferenciadas. Vascularização e a inervação ocorrem apenas em sua periferia. O músculo pterigóideo lateral insere-se na região anterior do côndilo mandibular, enviando feixes também para o disco articular. Esse músculo movimenta o côndilo para frente e para baixo durante os movimentos de abertura e protrusão mandibular (Ten Cate, 2001) (Figura 1).

Figura 1. Esquema ilustrativo da articulação Temporo-mandibular. A figura mostra a ATM em plano sagital. A) Côndilo mandibular; B) Eminência Articular; C) Disco articular; D) Superfície articular do côndilo mandibular E) Músculo Pterigóideo lateral e F) Zona bilaminar. (de www.emindsources.com/neer/tmj1.htm).

1.2 Cartilagem do Côndilo Mandibular

A cartilagem condilar reveste o côndilo da mandíbula. Ela é classificada como uma cartilagem secundária (Delatte *et al.*, 2004), pois sua formação embriológica é tardia em relação às outras cartilagens, como por exemplo a sincondrose da base do crânio e as cartilagens das cápsulas nasal e ocular, classificadas como primárias (Durkin, 1972,

Rønning, 1995).

Em sua porção mais superficial a cartilagem condilar é revestida por uma camada de tecido conjuntivo denso contendo poucos fibrócitos distribuídos em uma matriz densa rica em colágeno tipo I, com escassos fibroblastos dispersos entre as fibras colágenas. Tal revestimento aparece apenas em duas outras articulações do esqueleto humano: na esterno-clavicular e na acrômio-clavicular, que ligam a clavícula ao esqueleto apendicular (Sarnat e Wexler, 1966, Petrovic *et al.*, 1975, Ben-Ami *et al.*, 1991). Em um indivíduo jovem, a cartilagem condilar é do tipo hialina, mas ao final da segunda década de vida é completamente substituída por fibrocartilagem. Nesta fase a atividade proliferativa das células cessa, mas pode ser retomada, se necessário (Katchburian e Arana, 1999).

Da superfície para o interior da cartilagem condilar jovem podem ser observadas sete camadas distintas: uma primeira camada formada por tecido fibroso, denominada camada fibrosa, abaixo dela uma camada de células indiferenciadas, denominada de camada indiferenciada, cujas células se diferenciam formando uma nova porção, a camada de condroblastos. Estas células, por sua vez, amadurecem e formam a camada de condrócitos que sofrem hipertrofia e constituem a camada hipertrófica. Estas células finalmente originam a camada degenerativa, junto à zona de ossificação, onde osteoblastos depositam matriz óssea sobre porções de matriz cartilaginosa calcificada, ocorrendo o processo de ossificação endocondral (Ten Cate, 2001) (Figura 2).

Figura 2. Camadas da cartilagem do côndilo mandibular. Corte Sagital onde se distinguem as diferentes camadas da cartilagem condilar. F) camada fibrosa, I) camada indiferenciada, Cb) camada de condroblastos, Cc) camada de condrócitos H) camada hipertrófica, D) camada degenerativa e O) início da zona de ossificação. Coloração com hematoxilina e eosina (HE). Barra = 50 μ m.

Nas camadas indiferenciada e de condroblastos ocorre intensa proliferação, sendo conjuntamente denominadas de compartimento proliferativo (Inoue *et al.*, 1990, Hajjar *et al.*, 2003, Nakamura H, 2005). No presente estudo este termo será utilizado.

O crescimento da cartilagem do côndilo mandibular ocorre por divisão de células jovens do compartimento proliferativo e pode ser modulado por fatores genéticos, hormônios ou fatores de crescimento que agem tanto na direção quanto na magnitude do crescimento (Charlier *et al.*, 1968).

Quanto à composição da matriz extracelular (MEC), na cartilagem condilar de fetos humanos há presença de colágeno tipo II e condroitim sulfatado na camada de condroblastos, enquanto a camada indiferenciada apresenta mais colágeno do tipo I e fibronectina. A camada de condrócitos mostra forte metacromasia e há proteoglicanas por

toda a cartilagem, distribuídas de forma mais homogênea na camada hipertrófica (Ben-Ami *et al.*, 1991).

Assim como a cartilagem epifisária dos ossos longos, a cartilagem condilar é um importante centro de crescimento da mandíbula. Contudo, existem algumas diferenças entre elas relativas a:

1) Revestimento - a cartilagem condilar é revestida superficialmente por uma camada fibrosa, ao passo que a cartilagem epifisária é revestida em sua porção mais superficial por cartilagem hialina;

2) Proliferação – na cartilagem condilar a proliferação celular ocorre no compartimento proliferativo, localizado logo abaixo da camada fibrosa, enquanto na cartilagem epifisária a proliferação ocorre pela divisão dos condrócitos.

3) Direção de crescimento: a cartilagem condilar cresce em todas as direções, ao passo que o crescimento da cartilagem epifisária é unidirecional, incrementando o comprimento ósseo. Isso se reflete na disposição celular, aparentemente desorganizada na cartilagem condilar e formando colunas ordenadas de células na zona de cartilagem seriada da cartilagem epifisária (TenCate, 2001, Junqueira e Carneiro, 2004). Em ambas as cartilagens aparecem as camadas hipertrófica e degenerativa, servindo de suporte para a ossificação endocondral.

Além da divergência estrutural, há diferenças também no padrão de crescimento entre as duas cartilagens. Embora a atividade proliferativa de ambas diminua com o avanço da idade, na cartilagem condilar este potencial é de 4 a 6 vezes menor quando comparado ao da cartilagem epifisária no 21º dia de vida (Coprav *et al.*, 1988). Em fetos, o padrão de

crescimento da cartilagem do côndilo mandibular difere da placa epifisária de ossos longos e não tem correlação com o crescimento da mandíbula, indicando que as modificações condilares estão mais relacionadas a fatores locais do que aos mecanismos de crescimento geral do corpo (Berraquero *et al.*, 1995)

A expressão de colágeno X e de marcadores endoteliais na zona hipertrófica e de ossificação precedem o evento de ossificação endocondral (Anderson, 1995). Shen *et al.* (2005) sugerem que a expressão de colágeno X seja uma evidência direta do real crescimento condilar em resposta à protrusão mandibular em ratos (Shen *et al.*, 2006). Estes mesmos autores, a fim de estabelecer um padrão temporal de crescimento condilar, demonstraram que a forte expressão destes constituintes na camada hipertrófica e região de ossificação durante o período de maior crescimento condilar coincide com o período de crescimento somático durante a puberdade, acelerando a partir de 38 dias de idade, atingindo o crescimento máximo em 56 dias e diminuindo gradualmente após este período. Os autores sugerem que o uso de marcadores bioquímicos como indicadores de crescimento condilar pode ser uma nova abordagem para descrever o padrão de crescimento temporal do côndilo, como alternativa a técnicas menos sensíveis, incapazes de medir alterações sutis na matriz cartilaginosa e no processo de ossificação (Shen *et al.*, 2005).

1.3 Resposta da Cartilagem às Diferentes Forças Mecânicas

O crescimento da cartilagem pode ser modulado por forças mecânicas, que estimulam também a diferenciação celular (Meikle, 1973). A aplicação de forças relativamente pequenas parece ser suficiente para a modulação do crescimento condilar (Petrovic *et*

al., 1975, Yang e Luo, 1999). Vários estudos têm demonstrado que em animais jovens, a ATM e, especialmente, a cartilagem do côndilo mandibular, apresentam um crescimento compensatório em resposta à alteração da função oclusal (Charlier *et al.*, 1968, McNamara, 1973, Copray *et al.*, 1988, Stutzmann e Petrovic, 1990, Hajjar *et al.*, 2003). Como exemplo, uma simples alteração na consistência da dieta promove modificações na carga mastigatória e no posicionamento do côndilo dentro da cavidade glenóide, alterando a taxa de crescimento condilar e também a distribuição de enzimas relacionadas com a degradação da MEC (Kantomaa *et al.*, 1992, Tuominen *et al.*, 1994, Pirttiniemi *et al.*, 2004)

Em ratos e macacos, o uso de diferentes aparelhos ortopédicos funcionais que promovem a protrusão mandibular (hiperpropulsor mandibular, Fränkel, ativador de Andersen, ativador de Herren, ativador-L.S.U, elásticos para classe II e Bionator de Balters), aumentou a proliferação celular e o comprimento da mandíbula (McNamara, 1973, Petrovic *et al.*, 1975). Mesmo uma protrusão unilateral foi capaz de aumentar a proliferação celular e a espessura da cartilagem condilar no côndilo protruído, enquanto no lado oposto, onde ocorreu uma leve retrusão, os efeitos foram contrários (Fuentes *et al.*, 2003). Recentemente foi demonstrado que a protrusão mandibular aumenta a distribuição de colágeno X, considerado um possível marcador de crescimento, na zona hipertrófica na cartilagem condilar de ratos jovens, assim como a neovascularização e osteogênese (Xiong *et al.*, 2005).

Da mesma forma que a protrusão mandibular estimula a proliferação celular, a diminuição das forças aplicadas sobre a cartilagem condilar e a ação de forças de retrusão sobre a mandíbula reduzem a proliferação celular, afetando negativamente o

crescimento da cartilagem (Asano, 1986, Petrovic e Stutzmann, 1991, Teramoto *et al.*, 2003, Cholasueksa *et al.*, 2004, Pirttiniemi *et al.*, 2004). Alterações oclusais como o desgaste dos dentes incisivos inferiores de ratos também reduzem a proliferação celular na região posterior da cartilagem condilar, possivelmente pela diminuição da frequência e da extensão da protrusão da mandíbula decorrente da perda da guia incisal (Hinton, 1989).

In vitro, os efeitos de forças compressivas sobre a cartilagem variam de acordo com o tipo de tecido cartilaginoso, intensidade, qualidade e duração da força aplicada (Takano-Yamamoto T, 1991, Wolf *et al.*, 2003). Em células da calvária de ratos, diferentes tipos de forças compressivas são capazes de provocar um aumento na incorporação de [H3]-timidina e na síntese de DNA (Inoue *et al.*, 1990). Na cartilagem articular bovina, a compressão cíclica aumenta a síntese de proteínas estruturais da matriz e diminui a de proteoglicanas. O tipo da força parece ainda afetar qualitativamente as diferentes proteínas. Como exemplo, a compressão estática aumenta a síntese de fibronectina, enquanto a expressão da proteína oligomérica da matriz de cartilagem (COMP) é afetada pela compressão cíclica (Wong *et al.*, 1999). Esta proteína tem sido proposta como um novo bio-marcador para determinar a destruição do tecido em casos de artrite reumatóide (Yamamoto *et al.*, 2007).

A força mecânica intermitente tem se mostrado um potente estímulo anabólico quando comparada à força estática. Num estudo com cartilagem da base do crânio de coelhos, a força intermitente aumentou o tamanho e a área total do disco de crescimento, assim como o número de células na camada proliferativa (Wang e Mao, 2002). Foi também verificado um aumento da síntese de mRNA para colágeno II e agrecana promovido pela

força intermitente (Stoddart *et al.*, 2006). Ainda, a deformação da cartilagem condilar foi menor frente a uma força intermitente do que frente a uma força constante de mesma intensidade (Kuboki *et al.*, 1997).

1.4 Transmissão das Forças da MEC para os Condrócitos: Mecanotransdução

Mecanotransdução pode ser definida como a resposta bioquímica da célula a um estímulo mecânico (Lammerding *et al.*, 2004). Esta definição se baseia na percepção de forças mecânicas originadas do ambiente extracelular que são transduzidas para o interior da célula através da geração de sinais bioquímicos, alterando a estrutura e função celulares (Samarel, 2005).

Há mais de um século foi observado que a cartilagem responde a estímulos mecânicos e é capaz de se remodelar (Stoltz *et al.*, 2000). Vários estudos têm sido realizados com o intuito de entender como alterações na MEC promovidas pelas forças mecânicas são sinalizadas para os condrócitos.

Células interagem com moléculas da MEC por meio de receptores transmembrânicos como, por exemplo, as integrinas. Algumas integrinas que participam de complexos adesivos ligam-se indiretamente ao citoesqueleto gerando um componente de tensão entre a força contrátil do citoesqueleto e a força de resistência da MEC (BurrIDGE *et al.*, 1988). Seriam, portanto, possíveis mediadores dos estímulos mecânicos (Lee *et al.*, 2000, Millward-Sadler *et al.*, 2000, Mobasher *et al.*, 2002).

Integrinas estão ainda envolvidas em múltiplos processos de sinalização celular, desempenhando mais do que uma função estrutural de integrar o meio extra ao

intracelular (Loeser, 2000).

1.5 Integrinas

Integrinas são formadas por duas cadeias glicoprotéicas, uma α (120– 200kDa) e uma β (90– 100kDa), que se associam de forma não-covalente, formando dímeros. Atualmente existem 18 cadeias α e 8 β mas apesar do grande número de combinações possíveis entre essas subunidades, apenas 24 dímeros foram identificados até o momento (Juliano, 2002, Danen e Sonnenberg, 2003)

A especificidade de ligação de cada integrina às diferentes proteínas da MEC depende da combinação entre as cadeias α e β . As porções extracelulares de ambas subunidades interagem conjuntamente com seqüências específicas das proteínas da matriz (Hynes, 1999). Essa interação depende da presença de cátions divalentes no meio extracelular, preferencialmente Ca^{+2} ou Mg^{+2} .

A porção citoplasmática das integrinas é geralmente curta, não possui atividade enzimática intrínseca e, com freqüência, liga-se indiretamente a microfilamentos de actina no citoesqueleto (Pavalko *et al.*, 1991), onde ativam importantes cascatas de sinalização que regulam a proliferação, diferenciação, migração celular e apoptose (Juliano, 2002)

Acredita-se que no estado inativo a porção extracelular do dímero se curva e não interage com proteínas da MEC. Uma vez ativado, o dímero é estabilizado por ligações com a MEC ou por proteínas do citoesqueleto. A agregação lateral seria estabilizada por homoagregados de subunidades α formando dímeros e de subunidades β formando trímeros (Hynes, 2003).

Algumas integrinas reconhecem seqüências exclusivas de uma proteína, enquanto outras reconhecem seqüências presentes em grupos de proteínas. Uma destas seqüências é formada pelo tripeptídeo Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD), encontrada por exemplo na fibronectina, vitronectina, osteopontina, colágenos, trombosbondina, fibrinogênio e fator de von Willebrand (Ruoslahti e Pierschbacher, 1997). A tabela 1 apresenta integrinas e seus principais ligantes.

A expressão de integrinas na cartilagem varia conforme a idade, tipo e estado do tecido, se saudável ou não. Ensaios de imuno-histoquímica demonstraram que a cartilagem normal no côndilo do fêmur humano adulto expressa as subunidades $\alpha 1$, $\alpha 5$, αV , $\beta 1$, $\beta 4$ e $\beta 5$, mas não expressa $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 6$. Em cartilagens acometidas por osteoartrite, as subunidades $\alpha 2$, $\alpha 4$, e $\beta 2$ somam-se às expressas em situação normal (Ostergaard *et al.*, 1998).

A presença de dímeros também tem sido investigada, demonstrando que a cartilagem articular humana expressa predominantemente o dímero $\alpha 5\beta 1$ e, de forma menos evidente, $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$ (Salter *et al.*, 1992). Através de uma combinação de imuno-fluorescência, imuno-precipitação e análise em FACS, Woods *et al.* (1994) demonstraram a expressão de $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha V\beta 5$, acompanhados de fraca expressão de $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha V\beta 3$. A expressão de $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$ foi maior em condrócitos de fetos, condrócitos imortalizados ou células de condrosarcoma (Woods *et al.*, 1994, Knudson e Loeser, 2002).

Na cartilagem do côndilo mandibular de primatas, a integrina $\alpha 5\beta 1$ está amplamente distribuída pelas camadas celulares, principalmente nas células indiferenciadas, camada hipertrófica e zona de ossificação (Milam *et al.*, 1991).

Integrinas são importantes não apenas para a adesão, mas também para a proliferação e sobrevivência dos condrócitos (Holmvall *et al.*, 1995). Anticorpos anti-integrinas inibiram a condrogênese em embriões de ratos (Shakibaei, 1998), enquanto o bloqueio de integrinas com peptídeos contendo a sequência RGD inibiu a diferenciação de condrócitos da cartilagem epifisária (Woods *et al.*, 1994).

As integrinas participam também dos processos de despolarização ou hiperpolarização da membrana plasmática, possivelmente em conjunto com canais iônicos (Wright *et al.*, 1997). A aplicação de forças mecânicas intermitentes em cultura de condrócitos demonstrou que as subunidades $\alpha 5$ e $\beta 1$ podem estar envolvidas no processo de hiperpolarização, ao passo que a despolarização da membrana envolveria as subunidades αv , $\beta 1$, e $\beta 5$ (Millward-Sadler *et al.*, 2000).

Sadoshima e Izumo (1997) propuseram a formação de complexos mecanorreceptores entre integrinas e canais iônicos ativados por força de estiramento (*stretch-activated ion channel* – *SACs*) na resposta de miócitos cardíacos e na liberação de angiotensina pelas células. Assim, o processo de mecanotransdução parece envolver a ativação de integrinas na membrana plasmática (Sadoshima *et al.*, 1997, Sadoshima e Izumo, 1997) .

Tabela 1. Integrinas e seus principais ligantes

Subunidades	(1	□ □	□ □	□ □	□ □	□ □	□ □	□ □
□1	Colágeno I– IV Laminina							
□2	Colágeno I– VI Laminina Fibronectina							
□3	Laminina Nidogeno Entactina Fibronectina							
□4	Fibronectina VCAM-1*						MadCAM** Fibronectina VCAM-1	
□5	Fibronectina							
□6	Laminina			Laminina				
□7	Laminina							
□8	fibronectina							
□9	Osteopontina VCAM-1							
□10	Colágeno II							
□11	Colágeno I - IV							

Subunidades	(1	□ □	□ □	□ □	□ □	□ □	□ □	□ □
αD		V-CAM1 (provavelmente)						
αL		I-CAM *** 1-3						
αM		C3bi+ Fator X Fibrinogênio I-CAM 1						
αV	Fibronectina		Fibrinogênio Fibronectina Fator de VW++ Vitronectina Osteopontina Tsp#, BSp-1##		Vitronectina	Fibronectina		Fibronectina Fibrinogênio
αX		Fibrinogênio						
αIIb			Fibrinogênio Fibronectina Fator de VW					
αE							E-caderina	

*V-CAM: Molécula de adesão celular vascular

** MadCAM: molécula de adesão celular da mucosa

*** I-CAM: Molécula de adesão Intercelular

+ C3bi: Forma inativa do Complexo 3b do sistema imune

++ Fator de Von Willebrand

Tsp: Trombospondina

BSp: Sialoproteína óssea

1.6 Fibronectina

A fibronectina (FN) é uma glicoproteína de 490 kDa com funções biológicas variadas que está presente na matriz cartilaginosa, interagindo com outros componentes da MEC e com integrinas (Mao e Schwarzbauer, 2005). Entre suas funções estão a promoção da adesão e migração celular (Kwon *et al.*, 2007) e regulação da expressão gênica (Miyamoto *et al.*, 1998), inclusive de genes que codificam proteoglicanas (Burton-Wurster *et al.*, 1988, Lorenzo *et al.*, 2004). Está presente no início da condrogênese (Daniels e Solursh, 1991) e desempenha um papel crítico no desenvolvimento embrionário.

A FN é formada por dois polipeptídeos similares ligados em sua porção carboxi-terminal por duas pontes dissulfeto. Existem cerca de 20 isoformas de FN em humanos, todas derivadas de *splicing* alternativo (Schwarzbauer *et al.*, 1987, MacLeod *et al.*, 1996, Burton-Wurster *et al.*, 1997, Parker *et al.*, 2002). Algumas isoformas desempenham papel importante na regulação do metabolismo da cartilagem normal ou acometida pela osteoartrite (Brown e Jones, 1990, Burton-Wurster *et al.*, 1997). Na osteoartrite a expressão de FN está aumentada e seus fragmentos induzem a degradação das proteoglicanas, caracterizando a doença (Homandberg e Hui, 1994).

Forças mecânicas têm grande influência sobre a síntese de FN que varia de acordo com a intensidade, tipo e magnitude do estímulo (Chen e Sah, 1998, Steinmeyer *et al.*, 1999, Wong *et al.*, 1999). Por exemplo, uma força constante inibiu a síntese de FN, enquanto uma força intermitente da mesma magnitude não teve efeito (Burton-Wurster *et al.*, 1993). Um aumento na magnitude de uma força intermitente aumentou a expressão

de fibronectina na cartilagem articular bovina (Farquhar *et al.*, 1996).

Na cartilagem condilar de ratos, a expressão de FN também foi afetada pela alteração na consistência da dieta ou mudanças oclusais provocadas por extrações dentárias (Endo *et al.*, 1998). A aplicação de forças intermitentes na cartilagem condilar de fetos induziu a expressão de FN e colágeno I na camada hipertrófica próximo à zona de ossificação, enquanto em animais com 7 dias de idade este efeito foi observado na transição da camada de condrócitos para a hipertrófica (Nakai *et al.*, 1998), sugerindo que a direção da força exercida sobre o côndilo seja um fator relevante.

Embora Ishibashi e colaboradores (1986) tenham relatado que em humanos adultos a expressão de FN ocorre preferencialmente no compartimento proliferativo, na ATM de primatas a proteína foi observada em todas as camadas da cartilagem condilar e no osso já formado. Além disso, estava presente também na cápsula articular, membrana sinovial e zona bilaminar no disco articular (Milam *et al.*, 1991).

Clancy e colaboradores (1997) verificaram que a exposição de condrócitos à FN leva ao recrutamento do receptor $\alpha 5\beta 1$, acompanhado da formação de um complexo juncional contendo F-actina, cinase de adesão focal (FAK) e uma GTPase de baixo peso molecular reguladora do citoesqueleto, RhoA. Um dos efeitos desta via de sinalização foi o aumento da síntese de proteoglicanas; a adição de fatores de crescimento *Fibroblast Growth Factor* (FGF) e *Insulin-like Growth Factor* – I (IGF-I) também estimulou a síntese de proteoglicanas, sugerindo um efeito co-estimulatório na sinalização entre $\alpha 5\beta 1$ e os receptores para FGF e IGF-I (Clancy *et al.*, 1997).

1.7 Fatores de Crescimento IGF-I e IGF-II na Cartilagem Condilar

Além do efeito das forças mecânicas, o crescimento da cartilagem condilar pode ser modulado pela ação de hormônios e fatores de crescimento. Dentre estes, destacam-se o IGF-I e IGF-II.

IGF-I e IGF-II foram primeiramente descritos por Salmon e Daughaday (1957) e denominados fatores com atividade de sulfatação (SFA), substâncias que mediavam a ação do hormônio de crescimento (GH). O termo insulin-like veio posteriormente e foi proposto devido à sua estrutura altamente similar à da pró-insulina, sendo cerca de 50% homólogos a esta sequência de aminoácidos, embora com características funcionais diferentes. As sequências de aminoácidos do IGF-I e do IGF-II compartilham resíduos idênticos em 45 posições, o que lhes confere um grau de aproximadamente 76% de homologia (Zapf *et al.*, 1984, Hall e Tally, 1989, Sara e Hall, 1990).

Os IGFs são abundantemente secretados pelo fígado, por isso estão presentes em grandes quantidades no plasma. Sua disponibilidade nos tecidos é controlada por proteínas ligadoras presentes na MEC, as *IGF-Binding Proteins* (IGFBPs), que funcionam como uma reserva, prolongam a meia vida dos IGFs e neutralizam seus efeitos metabólicos.

Além de exercer uma função endócrina no crescimento geral, os IGFs apresentam também uma função autócrina/parácrina importante na regeneração e reparação tecidual, sendo produzidos por diversos tecidos (D'Ercole *et al.*, 1980, Adams *et al.*, 2006).

Os IGFs são mitógenos potentes que desempenham um papel central no crescimento e desenvolvimento da cartilagem estimulando a proliferação, diferenciação celular e a

síntese de matriz extracelular *in vivo* e *in vitro* (Trippel *et al.*, 1989, Loeser e Shanker, 2000, Mandl *et al.*, 2002, Loeser *et al.*, 2003). Recentemente, foi demonstrado, *in vitro*, que o IGF-I estimula a diferenciação de condrócitos que sofreram ativação da via das MAP cinases e do fator de transcrição Sox9, associados com um fenótipo menos diferenciado (Shakibaei *et al.*, 2006).

Em experimentos *in vitro*, foi demonstrado que tanto o hormônio do crescimento (GH) quanto o IGF-I promovem o crescimento da cartilagem condilar aumentando a proliferação celular, síntese de proteoglicanas, de colágeno e estimulando também a formação óssea (Maor *et al.*, 1989, Maor *et al.*, 1993, Jiao *et al.*, 1999, Jiao *et al.*, 2000, Itoh *et al.*, 2003).

Na cartilagem condilar de ratos recém-nascidos o receptor para IGF-I (IGF-IR) está distribuído principalmente na porção posterior, aumentando nas camadas mais profundas da cartilagem com o avançar da idade. Esta distribuição é bastante similar à distribuição do IGF-I (Li *et al.*, 1998, Hajjar *et al.*, 2003). Ao contrário, o receptor de GH, apesar de ser expresso na ATM, não foi observado na cartilagem condilar, sugerindo que o IGF-I é mais relevante para o crescimento da cartilagem condilar que o GH (Visnapuu *et al.*, 2001).

Aparelhos ortopédicos propulsores da mandíbula modularam positivamente a expressão de IGF-I e IGF-II tanto em nível protéico como gênico (Luo e Zhou, 1988, Zhou *et al.*, 1998, Fuentes *et al.*, 2003). Esta modulação pareceu ainda mais exacerbada na transição da puberdade para a vida adulta (Fuentes *et al.*, 2002). Este aumento na expressão dos fatores de crescimento foi acompanhado de uma maior proliferação celular, sugerindo que os dois fatores participam da adaptação condilar decorrente da terapia de reposicionamento da mandíbula (Hajjar *et al.*, 2003).

2 CONCLUSÕES

As subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ e αv são expressas na cartilagem do côndilo mandibular de ratos durante o crescimento normal e sua expressão protéica é modulada pelo aparelho propulsor da mandíbula;

O aparelho também aumenta a expressão protéica e gênica da fibronectina e a proliferação celular na cartilagem condilar;

In vitro, forças de distensão exercidas sobre células da cartilagem condilar aumentam a expressão gênica de fibronectina, dos fatores de crescimento IGF-I e IGF-II e a proliferação celular, simulando os efeitos do aparelho *in vivo*;

A proliferação celular, expressão de IGF-I e fibronectina estimuladas por forças de distensão exercidas sobre células da cartilagem condilar são reguladas por integrinas ligantes da sequência RGD, enquanto a expressão de IGF-II, embora aumentada pelo estímulo mecânico, independe destas mesmas integrinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

*De acordo com:

International Comittee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. C2003 – [update 2005 June 15; cited 2006 May 16]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Adams D, McIntosh D, Wormald P, Cowin A. Differential effects of insulin-like growth factors on scratch wound repair in respiratory epithelial cells. *Am J Rhinol.* 2006;2006(6):652-657.

Anderson H. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Rel Res.* 1995;314:266-280.

Asano T. The effects of mandibular retractive force on the growing rat mandible. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1986;90(6):464-474.

Baume L, Derichsweiler H. Is the condylar growth center responsive to orthodontic therapy? An experimental study in *Macaca mulatta*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1961;14:347-362.

Ben-Ami Y, von der Mark K, Franzen A, Bernard BD, Lunazzi GC, Silbermann M. Immunohistochemical studies of the extracellular matrix in the condylar cartilage of the human fetal mandible: collagens and noncollagenous proteins. *Am J Anat.* 1991;190(2):157-166.

Berraquero R, Palacios J, Gamallo C, de la Rosa P, Rodriguez JI. Prenatal growth of the human mandibular condylar cartilage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1995;108(2):194-200.

Blumenfeld I, Gaspar R, Laufer D, Livne E. Enhancement of toluidine blue staining by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor and growth hormone in the temporomandibular joint of aged mice. *Cells Tissues Organs.* 2000;167(2-3):121-129.

Brown R, Jones K. The synthesis and accumulation of fibronectin by human articular cartilage. *J Rheumatol* 1990;17(1):65-72.

Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C. Focal Adhesions: Transmembrane Junctions Between the Extracellular Matrix and the Cytoskeleton. *Annual Review of Cell Biology.* 1988;4(1):487-525.

Burton-Wurster N, Horn V, Lust G. Immunohistochemical localization of fibronectin and chondronectin in canine articular cartilage. *J Histochem Cytochem.* 1988;36(6):581-588.

Burton-Wurster N, Lust G, Macleod J. Cartilage fibronectin isoforms: in search of functions for a special population of matrix glycoproteins. *Matrix Biology*. 1997;15(7):441-454.

Burton-Wurster N, Vernier-Singer M, Farquhar T, Lust G. Effect of compressive loading and unloading on the synthesis of total protein, proteoglycan, and fibronectin by canine cartilage explants. *J Orthop Res*. 1993;11(5):717-729.

Charlier J, Petrovic A, Herrmann J. Determinism of mandibular growth: effects of hyperpropulsion and of the somatotropic hormone on the growth of the condyle in young rats. *Orthod Fr*. 1968;39:567-579.

Chen A, Sah R. Effect of static compression on proteoglycan biosynthesis by chondrocytes transplanted to articular cartilage in vitro. *J Orthop Res*. 1998;16(5):542-550.

Cholasueksa P, Warita H, Soma K. Alterations of the rat temporomandibular joint in functional posterior displacement of the mandible. *Angle Orthod*. 2004;74(5):677-683.

Clancy R, Rediske J, Tang X, Nijher N, Frenkel S, Philips M, Abramson S. Outside-in signaling in the chondrocyte. Nitric oxide disrupts fibronectin-induced assembly of a subplasmalemmal actin/rho A/focal adhesion kinase signaling complex. *J Clin Invest*. 1997;100(7):1789-1796.

Copray J, Dibbets J, Kantomaa T. The role of condylar cartilage in the development of the temporomandibular joint. *Angle Orthod*. 1988 oct;58(4):369-380.

D'Ercole A, Applewhite G, Underwood L. Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. *Developmental Biology*. 1980;75(2):315-328.

Danen E, Sonnenberg A. Integrins in regulation of tissue development and function. *J Pathol*. 2003;200(4):471-480.

Daniels K, Solursh M. Modulation of chondrogenesis by the cytoskeleton and extracellular matrix. *J Cell Sci*. 1991;100(2):249-254.

Davenport-Goodall C, Boston R, Richardson D. Effects of insulin-like growth factor-II on the mitogenic and metabolic activities of equine articular cartilage with and without

interleukin 1-beta. *Am J Vet Res.* 2004;65(2):238-244.

Delatte M, Von den Hoff JW, van Rheden RE, Kuijpers-Jagtman AM. Primary and secondary cartilages of the neonatal rat: the femoral head and the mandibular condyle. 2004;112(2):156-162.

Durkin J. Secondary cartilage: a misnomer?. *Am J Orthod.* 1972;62(1):15-41.

Endo Y, Mizutani H, Yasue K, Senga K, Ueda M. Influence of food consistency and dental extractions on the rat mandibular condyle: a morphological, histological and immunohistochemical study. *J Craniomaxillofac Surg.* 1998;26(3).

Farquhar T, Xia Y, Mann K, Bertram J, Burton-Wurster N, Jelinski L, Lust G. Swelling and fibronectin accumulation in articular cartilage explants after cyclical impact. *J Orthop Res.* 1996;14(3):417-423.

Fisher MC, Meyer C, Garber G, Dealy CN. Role of IGFBP2, IGF-I and IGF-II in regulating long bone growth. *Bone.* 2005;37(6):741-750.

Fuentes M, Opperman L, Bellinger L, Carlson D, RJ. H. Regulation of cell proliferation in rat mandibular condylar cartilage in explant culture by insulin-like growth factor-1 and fibroblast growth factor-2. *Arch Oral Biol.* 2002;47(9).

Fuentes MA, Opperman LA, Buschang P, Bellinger LL, Carlson DS, Hinton RJ. Lateral functional shift of the mandible: Part II. Effects on gene expression in condylar cartilage. *Am J of Orthod Dentofacial Orthop.* 2003;123(2):160-166.

Ghafari J, Degroote C. Condylar cartilage response to continuous mandibular displacement in the rat. *Angle Orthod* 1986;56(1):49-57.

Goel HL, Moro L, King M, Teider N, Centrella M, McCarthy TL, Holgado-Madruga M, Wong AJ, Marra E, Languino LR. {beta}1 Integrins Modulate Cell Adhesion by Regulating Insulin-Like Growth Factor-II Levels in the Microenvironment. *Cancer Res.* 2006;66(1):331-342.

Hajjar D, Santos M, Kimura E. Propulsive appliance stimulates the synthesis of insulin-like

growth factors I and II in the mandibular condylar cartilage of young rats. *Arch Oral Biol.* 2003;48(9):635-642.

Hall K, Tally M. The somatomedin-insulin-like growth factors. *J Intern Med.* 1989;225(1):47-54.

Häusler G, Helmreich M, Marlovits S, Egerbacher M. Integrins and Extracellular Matrix Proteins in the Human Childhood and Adolescent Growth Plate. *Calcif Tissue Int.* 2002;71(3):212-218.

Hermanussen M, Lama MRd, F-Tresguerres J, Grasedyck L, Burmeister J. Short-term growth: evidence for chaotic series of mini growth spurts in rat growth. *Physiol Behav* 1998;64(1):7-13.

Hinton RJ. Effect of condylotomy on matrix synthesis and mineralization in the rat mandibular condylar cartilage. *Arch Oral Biol.* 1989;34(12):1003-1009.

Holmvall K, Camper L, Johansson S, Kimura JH, Lundgren-Akerlund E. Chondrocyte and Chondrosarcoma Cell Integrins with Affinity for Collagen Type II and Their Response to Mechanical Stress. *Experimental Cell Research.* 1995;221(2):496-503.

Homandberg GA, Hui F. High-Concentrations of Fibronectin Fragments Cause Short-Term Catabolic Effects in Cartilage Tissue While Lower Concentrations Cause Continuous Anabolic Effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1994;311(2):213-218.

Huang C, Hao L, Buetow D. Hypertrophy of cultured adult rat ventricular cardiomyocytes induced by antibodies against the insulin-like growth factor (IGF)-I or the IGF-I receptor is IGF-II-dependent. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2002;233(1):65-72.

Hynes RO. The dynamic dialogue between cells and matrices: Implications of fibronectin's elasticity. *PNAS.* 1999 March 16, 1999;96(6):2588-2590.

Hynes RO. Structural biology: changing partners. *Science.* 2003 May 2, 2003;300(5620):755-756.

Inoue H, Hiasa K, Samma Y, Nakamura O, Sakuda M, wamoto I, Suzuki F, Kato Y.

Stimulation of proteoglycan and DNA syntheses in chondrocytes by centrifugation. *J Dent Res.* 1990;69(9):1560-1563.

Itoh k, Suzuki S, Kuroda T. Effects of local administration of insulin-like growth factor-I on mandibular condylar growth in rats. *J Med Dent Sci.* 2003;50(1):79-85.

Jiao Y, Wang D, Han W. Effects of various growth factors on human mandibular condylar cartilage cell proliferation. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2000;35(5):346-349.

Jiao Y, Wang D, Han W, Li T. Effects of growth factors on DNA and collagen synthesis of human mandibular condylar cartilage cells. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 1999;17(4):358-360.

Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: Functions of Integrins, Cadherins, Selectins, and Immunoglobulin-Superfamily Members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002;42(1):283-323.

Junqueira L, Carneiro J. *Histologia Básica.* 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2004.

Kantomaa T, Pirttiniemi P. Changes in proteoglycan and collagen content in the mandibular condylar cartilage of the rabbit caused by an altered relationship between the condyle and glenoid fossa. *Eur J Orthod.* 1998 August 1, 1998;20(4):435-441.

Kantomaa T, Tuominen M, Pirttiniemi P, Ronning O. Weaning and the histology of the mandibular condyle in the rat. *Acta Anat (Basel)* 1992;144(4):311-315.

Katchburian E, Arana V. *Histologia e Embriologia Oral.* I ed. São Paulo: Editora médica Panamericana; 1999.

Kim S, Kim E, Kim Y, SBHahn, Lee J. The Modulation of Integrin Expression by the Extracellular Matrix in Articular Chondrocytes *Yonsei Med J.* 2003;44(3):493-501.

Knudson W, Loeser R. CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(1):36-44.

Kuboki T, Shinoda M, Orsini M, Yamashita A. Viscoelastic properties of the pig

temporomandibular joint articular soft tissues of the condyle and disc. *J Dent Res.* 1997;76(11):1760-1769.

Kumamoto H, Ooya K. Immunohistochemical detection of insulin-like growth factors, platelet-derived growth factor, and their receptors in ameloblastic tumors. *J Oral Pathol Med.* 2007;36(4):198– 206.

Kwon AH, Qiu Z, Hiraon Y. Effect of plasma fibronectin on the incisional wound healing in rats. *Surgery.* 2007;141(2):254-261.

Lammerding JAN, Kamm RD, Lee RT. Mechanotransduction in Cardiac Myocytes. *Ann NY Acad Sci.* 2004 May 1, 2004;1015(1):53-70.

Lee H, Millward-Sadler S, Wright M, Nuki G, Salter D. Integrin and mechanosensitive ion channel-dependent tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and beta-catenin in human articular chondrocytes after mechanical stimulation. *J Bone Miner Res.* 2000;15(8):1501-1509.

Li X, Zhou Z, Luo S. Expressions of IGF-1 and TGF-beta 1 in the condylar cartilages of rapidly growing rats. *Chin J Dent Res.* 1998;1(2):52-56.

Loeser R. Growth factor regulation of chondrocyte integrins. Differential effects of insulin-like growth factor 1 and transforming growth factor beta on alpha 1 beta 1 integrin expression and chondrocyte adhesion to type VI collagen. *Arthritis Rheum.* 1997;40(2):270-276.

Loeser R, Pacione C, Chubinskaya S. The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2003;48(8):2188-2196.

Loeser R, Shanker G. Autocrine stimulation by insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 2 mediates chondrocyte survival in vitro. *Arthritis Rheum.* 2000;43(7):1552-1559.

Loeser RF. Chondrocyte integrin expression and function. *Biorheology.* 2000;37(1-2):109-116.

Lorenzo P, Bayliss MT, Heinegard D. Altered patterns and synthesis of extracellular matrix macromolecules in early osteoarthritis. *Matrix Biol.* 2004;23(6):381-391.

Lou X, Chen Y, Luo S, Chen G. Circadian rhythm changes of the levels of endogenous insulin in growing rat condylar cartilage after functional mandibular protrusion. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2000;18(4):252-254.

Lucchinetti E, Bhargava MM, Torzilli P. The effect of mechanical load on integrin subunits $\alpha 5$ and $\beta 1$ in chondrocytes from mature and immature cartilage explants. *Cell Tissue Res.* 2004;315(3):385-391.

Luo S, Zhou Z. Induction of insulin-like growth factor I expression to mandibular advancement in growing rat condylar cartilage. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 1988;16(2):161-163.

Ma B, Sampson W, Fazzalari N, Wilson D, Wiebkin O. Experimental forward mandibular displacement in sheep. *Arch Oral Biol.* 2002;47(1):75-84.

MacLeod JN, Burton-Wurster N, Gu DN, Lust G. Fibronectin mRNA splice variant in articular cartilage lacks bases encoding the V, III-15, and I-10 protein segments. *J Biol Chem.* 1996;271(31):18954-18960.

Mandl EW, van der Veen SW, Verhaar JAN, van Osch GJVM. Serum-free medium supplemented with high-Concentration FGF2 for cell expansion culture of human ear chondrocytes promotes redifferentiation capacity. *Tissue Eng.* 2002;8(4):573-580.

Mao Y, Schwarzbauer JE. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol.* 2005;24(6):389-399.

Maor G, Hochberg Z, Silbermann M. Growth hormone stimulates the growth of mouse neonatal condylar cartilage in vitro. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1989;120(4):526-532.

Maor G, Hochberg Z, Silbermann M. Insulin-like growth factor I accelerates proliferation and differentiation of cartilage progenitor cells in cultures of neonatal mandibular condyles. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1993;128(1):56-64.

Martins JCR, Martins LP, Sakima MT. Ortodontia ou ortopedia funcional dos maxilares? Medcentercom 1996 [cited 2006 24 out]; Available from: <http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=207&idesp=14&ler=s>

Matsui Y, Nakata K, Araki N, Ozono K, Fujita Y, Tsumaki N, Kawabata H, Yasui N, Sekiguchi K, Yoshikawa H. Alternative splicing of fibronectin transcripts in osteochondrogenic tumors. *Anticancer Res.* 2001;21(2 (A)):1103-1106.

McNamara JJ. Neuromuscular and skeletal adaptations to altered function in the orofacial region. *Am J Orthod.* 1973;64(6):578-606.

Meikle M. The role of the condyle in the postnatal growth of the mandible. *Am J Orthod.* 1973;64(1):50-62.

Milam S, Klebe R, Triplett R, Herbert D. Characterization of the extracellular matrix of the primate temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg.* 1991;49(4):381-391.

Millward-Sadler S, Wright M, Lee H, Caldwell H, Nuki G, Salter D. Altered electrophysiological responses to mechanical stimulation and abnormal signalling through alpha5beta1 integrin in chondrocytes from osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2000;8(4):272-278.

Minoru T, Hiromitsu S. Signaling pathway of insulin-like growth factor-II as a target of molecular therapy for hepatoblastoma. *World J Gastroenterol* 2006;28(12):6531-6535.

Miyamoto S, Kathz B-Z, Lafrenie RM, Yamada KM. Fibronectin and Integrins in Cell Adhesion, Signaling, and Morphogenesis. *Ann NY Acad Sci.* 1998 October 23, 1998;857(1):119-129.

Mizoguchi I, Ichiro T, Yasuyuki S, Manabu K, Hideo M. Localization of types I, II and III collagen and glycosaminoglycans in the mandibular condyle of growing monkeys: an immunohistochemical study. *Anat Embryol.* 1997;195(2):127-135.

Mobasheri A, Carter SD, Martin-Vasallo P, Shakibaei M. Integrins and stretch activated ion channels; putative components of functional cell surface mechanoreceptors in articular chondrocytes. *Cell Biol Int.* 2002;26(1):1-18.

Nakai H, Niimi A, Ueda M. The influence of compressive loading on growth of cartilage of the mandibular condyle in vitro. *Arch Oral Biol*. 1998;43(7):505-515.

Nakamura H, Kimura K, Hirata A, Inoue M, Yamamoto T. Localization of CD44 (hyaluronan receptor) and hyaluronan in rat mandibular condyle. *J Histochem Cytochem*. 2005;53(1):113-120.

Olney RC, Mougey EB. Expression of the components of the insulin-like growth factor axis across the growth-plate. *Mol Cellular Endocrinol*. 1999;156(1-2):63-71.

Omblus J, Malmgren O, Hagg U. Mandibular growth during initial treatment with the Bass orthopaedic appliance in relation to age and growth periods. *Eur J Orthod*. 1997;19(1):47-56.

Ostergaard K, Salter DM, Petersen J, Bendtzen K, Hvolris J, Andersen CB. Expression of alpha and beta subunits of the integrin superfamily in articular cartilage from macroscopically normal and osteoarthritic human femoral heads. *Ann Rheum Dis*. 1998;57(5):303-308.

Oudet C, Petrovic A. Growth rhythms of the cartilage of the mandibular condyle: effects of orthopaedic appliances. *Int J Chronobiol*. 1978;5(4):545-564.

Parker AE, Boutell J, Carr A, Maciewicz RA. Novel cartilage-specific splice variants of fibronectin. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2002;10(7):528-534.

Pavalko FM, Otey CA, Simon KO, Burrige K. Alpha-actinin: a direct link between actin and integrins. *Biochem Soc Trans*. 1991;19(4):1065-1069.

Petrovic A. Mechanisms and regulation of mandibular condylar growth. *Acta Morphol Neerl Scand*. 1972;10(1):25-34.

Petrovic A, Stutzmann J. Effects on the rat mandible of a chincup-type appliance and of partial or complete immobilization. *Proc Finn Dent Soc*. 1991;87(1):85-91.

Petrovic A, Stutzmann J, Oudet C. Control processes in the postnatal growth of the condylar cartilage of the mandible. In: *development Cfhga*, editor. *Determinants of*

mandibular form and growth. Ann Arbor, Michigan McNamara JA Jr 1975. p. 101-153.

Petrovic A, Stutzmann J, Oudet C. Seasonal variations in the direction of growth of the mandibular condyle. Prog Clin Biol Res. 1981;59C(00):195-201.

Pirttiniemi P, Kantomaa T, Sorsa T. Effect of decreased loading on the metabolic activity of the mandibular condylar cartilage in the rat. Eur J Orthod. 2004;26(1):1-5.

Pulai J, Carlo MD, Loeser R. The alpha5beta1 integrin provides matrix survival signals for normal and osteoarthritic human articular chondrocytes in vitro. Arthritis Rheum. 2002;46(6):1528-1535.

Ramirez-Yañez GO, Daley TJ, Symons AL, Young WG. Incisor disocclusion in rats affects mandibular condylar cartilage at the cellular level. Arch Oral Biol. 2004;49(5):393-400.

Ritter MR, Dorrell MI, Edmonds J, Friedlander SF, Friedlander M. From the Cover: Insulin-like growth factor 2 and potential regulators of hemangioma growth and involution identified by large-scale expression analysis. PNAS. 2002 May 28, 2002;99(11):7455-7460.

Rönning O. Basicranial synchondroses and the mandibular condyle in craniofacial growth. Acta Odontol Scand. 1995;53(3):162-166.

Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Science. 1997;238(4823):491-197.

Sadoshima J, Aoki H, Izumo S. Angiotensin II and Serum Differentially Regulate Expression of Cyclins, Activity of Cyclin-Dependent Kinases, and Phosphorylation of Retinoblastoma Gene Product in Neonatal Cardiac Myocytes. Circ Res. 1997 February 1, 1997;80(2):228-241.

Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. Ann Review Physiol. 1997;59(1):551-571.

Salter DM, Hughes DE, Simpson R, Gardner DL. Integrin expression by human articular chondrocytes. Rheumatology. 1992 April 1, 1992;31(4):231-234.

Samarel AM. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(6):H2291-2301.

Sara VR, Hall K. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev*. 1990;70(3):591-614.

Sarnat B, Wexler M. Growth of the face and jaws after resection of the septal cartilage in the rabbit. *Am J Anat*. 1966;118(3):755-767.

Schwarzbauer J, Patel R, Onda D, Hynes R. Multiple sites of alternative splicing of the rat fibronectin gene transcript. *EMBO J* 1987;6(9):2573-2580.

Shakibaei M. Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody in vitro. *Exp Cell Res*. 1998;240(1):95-106.

Shakibaei M, John T, Souza PD, Rahmanzadeh R, Merker HJ. Signal transduction by beta1 integrin receptors in human chondrocytes in vitro: collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem J*. 1999 Sep 15, 1999;342(3):615-623.

Shakibaei M, Seifarth C, John T, Rahmanzadeh M, Mobasheri A. Igf-I extends the chondrogenic potential of human articular chondrocytes in vitro: Molecular association between Sox9 and Erk1/2. *Biochem Pharmacol*. 2006;72(11):1382-1395.

Shen G, Hagg U, Rabie AB, Kaluarachchi K. Identification of temporal pattern of mandibular condylar growth: a molecular and biochemical experiment. *Orthod Craniofac Res*. 2005;8(2):114-122.

Shen G, Rabie AB, Zhao ZH, Kaluarachchi K. Forward deviation of the mandibular condyle enhances endochondral ossification of condylar cartilage indicated by increased expression of type X collagen. *Arch Oral Biol*. 2006;51(4):315-324.

Shinar DM, Endo N, Halperin D, Rodan GA, Weinreb M. Differential expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II messenger ribonucleic acid in growing rat bone. *Endocrinology*. 1993;132(3):1158-1167.

Simões WA. Ortopedia funcional dos maxilares- vista através da reabilitação neuro-

oclusal. 1 ed. São Paulo; 1995.

Sironen R, Karjalainen H, Torronen K, Elo M, Kaarniranta K, Takigawa M, Helminen H, Lammi M. High pressure effects on cellular expression profile and mRNA stability. A cDNAarray analysis. *Biorheology*. 2002;39(1-2):111-117.

Steinmeyer J, Knue S, Raiss RX, Pelzer I. Effects of intermittently applied cyclic loading on proteoglycan metabolism and swelling behaviour of articular cartilage explants. *Osteoarthritis and Cartilage*. 1999;7(2):155-164.

Stoddart MJ, Ettinger L, Häuselmann HJ. Enhanced matrix synthesis in de novo, scaffold free cartilage-like tissue subjected to compression and shear. *Biotechnol Bioeng*. 2006;95(6):1043-1051.

Stoltz J, Dumas D, Wang X, Payan E, Mainard D, Paulus F, Maurice G, Netter P, S. M. Influence of mechanical forces on cells and tissues. *Biorheology*. 2000;37(1-2):3-14.

Stutzmann JJ, Petrovic AG. Role of the lateral pterygoid muscle and meniscotemporomandibular frenum in spontaneous growth of the mandible and in growth stimulated by the postural hyperpropulsor. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1990;97(5):381-392.

Takahashi I, Onodera K, Sasano Y, Mizoguchi I, Bae J, Mitani H, Kagayama M, Mitani H. Effect of stretching on gene expression of beta1 integrin and focal adhesion kinase and on chondrogenesis through cell-extracellular matrix interactions. *Eur J Cell Biol*. 2003;82(4):182-192.

Takano-Yamamoto T SS, Nakagawa K, Kobayashi Y, Kawakami M, Sakuda M. Comparison of the effects of hydrostatic compressive force on glycosaminoglycan synthesis and proliferation in rabbit chondrocytes from andibular condylar cartilage, nasal septum, and spheno-occipital synchondrosis in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1991;99(5):448-455.

Ten Cate AR. *Histologia Bucal*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2001.

Teramoto M, Kaneko S, Shibata S, Yanagishita M, Soma K. Effect of compressive forces

on extracellular matrix in rat mandibular condylar cartilage. *J Bone Miner Metab.* 2003;21(5):276-286.

Trippel S, Corvol M, Dumontier M, Rappaport R, Hung H, Mankin H. Effect of somatomedin-C/insulin-like growth factor I and growth hormone on cultured growth plate and articular chondrocytes. *Pediatr Res* 1989;25(1):76-82.

Tuominen M, Kantomaa T, Pirttiniemi P. Effect of altered loading on condylar growth in the rat. *Acta Odontol Scand.* 1994;53(3):129-134.

Visnapuu V, Peltomaki T, Ronning O, Vahlberg T, Helenius H. Growth hormone and insulin-like growth factor I receptors in the temporomandibular joint of the rat. *J Dent Res.* 2001;80(10):1903-1907.

Wang X, Mao JJ. Chondrocyte Proliferation of the Cranial Base Cartilage upon in vivo Mechanical Stresses. *J Dent Res.* 2002;81(10):701-705.

Wolf A, Raiss RX, Steinmeyer J. Fibronectin metabolism of cartilage explants in response to the frequency of intermittent loading. *J Orthop Res.* 2003;21(6):1081-1089.

Wong M, Siegrist M, Cao X. Cyclic compression of articular cartilage explants is associated with progressive consolidation and altered expression pattern of extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* 1999;18(4):391-399.

Woods VJ, Schreck P, Gesink D, Pacheco H, Amiel D, Akeson W, Lotz M. Integrin expression by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 1994;37(4):537-544.

Wright MO, Nishida K, Bavington C, Godolphin JL, Dunne E, Walmsley S, Jobanputra P, Nuki G, Salter DM. Hyperpolarisation of cultured human chondrocytes following cyclical pressure-induced strain: Evidence of a role for $\alpha 5 \beta 1$ integrin as a chondrocyte mechanoreceptor. *J Orthop Res.* 1997;15(5):742-747.

Xiong H, Rabie A, Hagg U. Neovascularization and mandibular condylar bone remodeling in adult rats under mechanical strain. *Front Biosci.* 2005;1(10):74-82.

Yamada S, Saeki S, Takahashi I, Igarashi K, Shinoda H, Mitani H. Diurnal Variation in the

Response of the Mandible to Orthopedic Force. *J Dent Res*. 2002;81(10):711-715.

Yamamoto M, Takahashi H, Ohara M, Suzuki C, Naishiro Y, Yamamoto H, Shinomura Y, Imai. K. Evidence of cartilaginous benefit of treatment with infliximab in rheumatoid arthritis using measurement of serum COMP. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2007;30(1):41-47.

Yang H, Luo S. Study on mechanical compression regulating the proliferation of rat mandibular condylar chondrocytes in vitro. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 1999;17(4):331-334.

Zapf J, Schmid C, Froesch E. Biological and immunological properties of insulin-like growth factors (IGF) I and II. *Clin Endocrinol Metab*. 1984;13(1):3-30.

Zhou Z, Luo S, Liu C. Activation of insulin-like growth factor 1 gene expression in growing rat condyle by functional mandibular protrusion. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 1998;33(6):369-371.