

CÁSSIO GUIMARÃES

ESTUDO DOS MIOFIBROBLASTOS NA GENGIVITE E PERIODONTITE

CAMPINAS
2008

CÁSSIO GUIMARÃES

ESTUDO DOS MIOFIBROBLASTOS NA GENGIVITE E PERIODONTITE

Dissertação apresentada ao Centro de Pós Graduação / CPO São Leopoldo Mandic, para obtenção do grau de mestre em Odontologia.

Área de concentração: Patologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Furuse.

CAMPINAS
2008

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca "São Leopoldo Mandic"

G963e Guimarães, Cássio.
Estudo dos miofibroblastos na gengivite e periodontite / Cássio
Guimarães. – Campinas: [s.n.], 2008.
53f.: il.

Orientador: Cristiane Furuse.
Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) – C.P.O. São
Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação.

1. Gengivite. 2. Imunoistoquímica. 3. Periodontite. 4. Patologia
Bucal. I. Furuse, Cristiane. II. C.P.O. São Leopoldo Mandic –
Centro de Pós-Graduação. III. Título.

**C.P.O. - CENTRO DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS
SÃO LEOPOLDO MANDIC**

Folha de Aprovação

A dissertação intitulada: “**Estudo dos miofibroblastos na gengivite e periodontite**” apresentada ao Centro de Pós-Graduação, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração: _____ em __/__/____, à comissão examinadora abaixo denominada, foi aprovada após liberação pelo orientador.

Prof. (a) Dr (a) Cristiane Furuse
Orientador

Prof. (a) Dr (a) Vera Cavalcanti de Araújo
1º Membro

Prof. (a) Dr (a) Elizabeth Ferreira Martinez
2º Membro

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus pais, Flávio e Maria das Dores “*in memoriam*”.

Ao Professor e amigo Juracy Correa da Silveira.

A eles, minha mais profunda e eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Aos professores da Patologia Bucal: Dra. Vera Cavalcanti de Araújo e Dra. Patrícia Ramos Cury, meus sinceros agradecimentos pelos conhecimentos transmitidos.

Em especial, à Profa. Dra. Cristiane Furuse, por sua paciência, dedicação e na orientação deste trabalho.

Aos professores de Cirurgia e Estomatologia Dr. Rubens, Dr. Alexandre, Dra. Daniela e Dr. Paulo, pelo enriquecimento das reuniões anátomo-clínicas.

Audrey e Jeruza, técnicas do Laboratório de Patologia Bucal do CPO São Leopoldo Mandic, pelo auxílio na confecção da parte experimental deste trabalho.

Aos colegas de turma Ana, Alexandre, Cristiane, Carol, Flávio, Guilherme, José Antônio, Larissa, Letícia, Lucyene e Sérgio, pela amizade, maior fruto do nosso convívio.

Ao meu parceiro e compadre, Zé Antônio, pelo incentivo e companheirismo durante o todo o curso.

Aos funcionários da Biblioteca, pelo espírito de cooperação.

À minha família, pelo apoio e pelas orações.

Minha namorada, Silvana, por toda sua compreensão nos momentos em que estivemos longe um do outro.

Donizete, fiel amigo e companheiro do traslado.

A todos que diretamente ou indiretamente participaram da elaboração desse trabalho.

“A descoberta consiste em ver o que todos já viram, e pensar o que ninguém pensou”.

Albert Szent Györgyi

RESUMO

O miofibroblasto é uma célula mesenquimal altamente diferenciada, tendo características funcionais e estruturais comuns com as células de músculo liso e fibroblastos. São tipos celulares predominante nos tecidos de granulação da gengivite e periodontite, na contração das feridas, nas doenças fibrocontratéis e também presentes em alguns tecidos em desenvolvimento e em tecidos normais. O objetivo deste estudo foi avaliar, através da imunoexpressão da desmina, miosina, α -actina de músculo liso (AML) e calponina, a sua presença em dez casos de tecido gengival normal, dez de gengivite e dez de periodontite. Dos trinta casos estudados apenas dois casos de gengivite e dois de periodontite apresentaram miofibroblastos positivos para AML, sendo negativos para os demais anticorpos. Nos casos positivos, apenas raros miofibroblastos estavam presentes, sendo em quantidade discretamente maior nas periodontites. Os miofibroblastos localizaram-se abaixo das áreas inflamadas, entremeados a fibras colágenas arranjadas em feixes espessos e paralelos. Conclui-se que não foram observados miofibroblastos nas amostras de tecido gengival normal, somente 02 casos de gengivite e 02 de periodontite apresentaram miofibroblastos e apenas a AML evidenciou os miofibroblastos.

Palavras-chave: Miofibroblastos. Gengivite. Periodontite. Imunoistoquímica.

ABSTRACT

Myofibroblasts are highly differentiated mesenchymal cells with structural and functional features similar to smooth muscle cells and fibroblasts. They are the predominant cellular type in the granulation tissue of gingivitis and periodontitis, in the contraction of the wounds, in the fibro-contractile diseases and they are also present in some tissues in development and in normal tissues. The aim of this study was to evaluate the immunoexpression of α -smooth muscle actin (SMA), miosin, desmin, and calponin in ten normal gingival specimens, ten gingivitis and ten periodontitis. Of the thirty cases studied only two cases of gingivitis and in two of periodontitis showed positive myofibroblasts for α -smooth muscle actin, being negative for the others antibodies. In the positive cases only rare myofibroblasts were present and in a more discret quantity in periodontitis. The myofibroblasts were situated below the inflamed area, intermixed with dense collagen fibers organized in paralell thick bundles. In conclusion, myofibroblasts were not observed in normal gingival tissue, only two cases of gingivitis and two of periodontitis presented myofibroblasts, and only α -smoth muscle actin was able to show the myofibroblasts.

Keywords: Myofibroblasts. Gingivitis. Periodontitis. Immunohistochemical.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MMPs	- Metaloproteinases
α -AML	- Alfa-actina de músculo liso
FDGF	- Fator de crescimento derivado de plaquetas
FGF	- Fator de crescimento fibroblástico
GM-CSF	- Fator estimulador de colônias granulócito-mastócito
TGF- β_1	- Fator de transformação de crescimento beta 1
INF- γ	- Interferon gama
TNF α	- Fator de necrose tumoral alfa
IL-1	- Interleucina 1
IL-2	- Interleucina 2
FGF/h	- Fator de crescimento fibroblástico e heparina
V	- Fenótipo dos miofibroblastos que expressam vimentina
VA	- Fenótipo dos miofibroblastos que expressam vimentina e AML
VA(D)M	- Fenótipo dos miofibroblastos que expressam vimentina, AML, miosina com ou sem desmina
VAD	- Fenótipo dos miofibroblastos que expressam vimentina, AML e desmina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Periodonto Normal	12
2.2 Biopatologia da progressão da doença periodontal	14
2.2.1 Gengivite	15
2.2.2 Periodontite	16
2.3 Fibroblasto	17
2.4 Miofibroblastos	18
2.5 Proteínas Miogênicas.....	27
2.5.1 <i>α-actina de músculo liso</i>	27
2.5.2 <i>Calponina</i>	28
2.5.3 <i>Desmina</i>	29
2.5.4 <i>Miosina</i>	30
3 PROPOSIÇÃO	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
5 RESULTADOS.....	37
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXO A - FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	53

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma das patologias crônicas mais prevalentes da raça humana e pode levar à destruição dos tecidos de suporte do dente e conseqüente perda do dente. A busca do conhecimento dos aspectos clínicos e histopatológicos da gengiva normal e da sua contraparte patológica, gengivite e periodontite, bem como de seus mecanismos etiopatogênicos como formação e desenvolvimento do biofilme bacteriano e a interação dos agentes bacterianos e seus substratos com os tecidos periodontais tem levado a um grande número de pesquisas. É geralmente aceito que os miofibroblastos apresentam um papel chave na reconstrução fisiológica do tecido conjuntivo depois da injúria e nas deformidades patológicas que caracterizam as doenças fibróticas (Estes et al., 1994; Gabbiani et al., 2003; Hinz, 2007). Entretanto, nas doenças periodontais inflamatórias, essa célula com específicas particularidades é pouco estudada.

O miofibroblasto foi descrito originalmente nos tecidos de granulação e deste então tem sido visto em várias condições como nos fenômenos de contração das feridas, cicatrizes hipertróficas, em algumas lesões caracterizadas por fibrose e retração como fibromatoses, cirrose hepática, pulmonar, renal e em condições neoplásicas e não-neoplásicas, bem como em condições fisiológicas (Gabbiani, 1992, 1998).

O miofibroblasto é definido essencialmente por sua ultra-estrutura como uma célula altamente diferenciada com organelas especializadas, tendo características comuns com fibroblastos e células musculares lisas, apresentando capacidade contrátil.

Nesse estudo buscamos verificar a presença de miofibroblastos na gengivite e periodontite por meio da técnica imunohistoquímica utilizando anticorpos contra proteínas miogênicas, entre elas, a α -actina de músculo liso, a calponina, a miosina e a desmina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Periodonto Normal

O periodonto consiste em tecido de recobrimento, a gengiva, cuja principal função é proteger os tecidos subjacentes, e de suporte do dente, composto pelo ligamento periodontal, cemento e osso alveolar (Lindhe, 2005).

Em um adulto, a gengiva normal recobre a crista do processo alveolar e a raiz do dente em um nível coronal à junção amelocementária. A gengiva é dividida clinicamente em inserida, marginal e área interdental. Apesar de cada tipo de gengiva exibir considerável variação em sua diferenciação, histologia e espessura, de acordo com a demanda funcional, todos os tipos são especificamente estruturados para funcionar apropriadamente contra danos mecânicos e microbianos. Isto é, a estrutura específica das diferentes gengivas reflete sua efetividade como uma barreira à penetração por microrganismos e agentes nocivos em tecidos mais profundos (Newman et al., 2007).

O exame microscópico revela que a gengiva é composta pelo epitélio pavimentoso estratificado e uma porção subjacente de tecido conjuntivo denominada lâmina própria (Lindhle, 2005).

O epitélio gengival consiste em uma superfície contínua de epitélio pavimentoso estratificado e três diferentes áreas podem ser definidas do ponto de vista morfológico e funcional: epitélio externo ou oral, epitélio sulcular e epitélio juncional. O principal tipo celular do epitélio gengival é o queratinócito. Outras células encontradas no epitélio são as células claras ou não-queratinócitos, que incluem as células de Langerhans, células de Merkel e melanócitos (Newman et al.,

2007).

O epitélio oral é composto de quatro camadas: estrato germinativo (camada basal), estrato espinhoso (camada de células espinhosas), estrato granuloso (camada granular) e estrato córneo (camada queratinizada). Em média, o epitélio oral mede 0,2 a 0,3 mm em espessura (Newman et al., 2007).

O grau de ceratinização gengival diminui com a idade e o início da menopausa, contudo não está necessariamente relacionado às diferentes fases do ciclo menstrual (Newman et al., 2007).

O tecido conjuntivo gengival é um tecido conjuntivo denso que contém elementos que se originam diretamente do tecido conjuntivo da mucosa oral, assim como algumas fibras (dentogengivais) que se originam do folículo dental em desenvolvimento. É conhecido como lâmina própria e consiste em duas camadas: a) uma camada papilar, subjacente ao epitélio, que consiste em projeções papilares entre os prolongamentos das cristas epiteliais; b) uma camada reticular contígua com o periósteo do osso alveolar. O tecido conjuntivo possui um compartimento celular e outro extracelular compostos por fibras e matriz extracelular não fibrosa. Os principais componentes são: fibras colágenas (aproximadamente 60% por volume), fibroblastos (5%), vasos, nervos e matriz extracelular (aproximadamente 35%).

O elemento celular preponderante no tecido gengival é o fibroblasto. Entretanto, outras células estão também presentes. Os mastócitos, que estão distribuídos por todo o organismo, são numerosos no tecido conjuntivo da mucosa oral e da gengiva. Células de Langerhans e histiócitos estão presentes como componentes do sistema fagocítico mononuclear (sistema reticuloendotelial) Adipócitos e eosinófilos, apesar de raros, são também observados na lâmina própria. Na gengiva clinicamente normal, pequenos focos de plasmócitos, linfócitos e

neutrófilos são encontrados próximo à base do sulco gengival (Newman et al., 2007).

O espaço entre as fibras e células é preenchido pela matriz extracelular não fibrosa que possui um alto conteúdo de água e proteoglicanos (ácido hialurônico e condroitina sulfato) e glicoproteínas, principalmente a fibronectina (Lindlhe, 2005).

2.2 Biopatologia da progressão da doença periodontal

O processo patogênico das doenças periodontais é, em grande parte, induzida pela resposta do hospedeiro aos microorganismos resultando na destruição tecidual. Esses processos destrutivos são iniciados por bactérias, principalmente pelas lipopolissacarídeos (LPS), mas são propagados pelo hospedeiro. Os patógenos periodontais produzem produtos nocivos e enzimas (p. ex: hialuronidases, colagenases, proteases) que lisam componentes da matriz extracelular tais como o colágeno e até mesmo membranas celulares do hospedeiro a fim de produzirem nutrientes para seu crescimento e subsequente invasão tecidual. As proteinases cisteínicas Arg e Lys-gingipaína produzidas pelo *Porphyromonas gingivalis* são fatores-chave da virulência e acredita-se que sejam essenciais para a significativa degradação dos componentes teciduais, levando à invasão dos tecidos do hospedeiro (Kumagai et al., 2005).

Uma vez que os processos imunes e inflamatórios são iniciados, diferentes moléculas inflamatórias incluindo proteases, metaloproteinases (MMPs), citocinas, prostaglandinas e enzimas do hospedeiro são liberadas pelos leucócitos, fibroblastos ou células estruturais dos tecidos. As proteases tendem a romper a estrutura do colágeno dos tecidos criando, assim, incisões para uma posterior

infiltração leucocitária. Embora a produção de colagenases pelos neutrófilos infiltrantes seja parte da resposta natural do hospedeiro à infecção, existe um equilíbrio entre o nível de MMPs histodestrutivas e os seus inibidores endógenos na doença periodontal e em outras doenças inflamatórias (Newman et al., 2007).

À medida que a doença periodontal progride, as fibras colágenas e a fixação conjuntiva aos dentes são destruídas, as células epiteliais proliferam apicalmente ao longo da superfície da raiz e as bolsas periodontais se aprofundam. Enquanto o epitélio juncional migra apicalmente, assim também o faz a extensão do infiltrado inflamatório tecidual. Além disso, osteoclastos ativados iniciam a destruição óssea (Newman et al., 2007).

Uma vez que o padrão destrutivo continua, o acúmulo do biofilme subgingival aumenta, com o subsequente aumento da densidade microbiana para propagar ainda mais a lesão destrutiva periodontal. À medida que a bolsa periodontal se aprofunda, a flora se torna mais anaeróbia e a resposta do hospedeiro fica mais destrutiva e crônica. Eventualmente, a lesão da periodontite progride a tal ponto que o dente é perdido (Palmer et al., 2006).

2.2.1 Gengivite

Gengivite é a inflamação gengival resultante da interação entre os microrganismos encontrados no biofilme dental, os tecidos e as células inflamatórias do hospedeiro. A interação biofilme-hospedeiro pode ser alterada pelos efeitos de fatores locais, fatores sistêmicos e medicamentos, todos os quais podendo influenciar a gravidade e duração da resposta. Esses fatores são contribuintes pela sua capacidade de reter microrganismos do biofilme e inibir sua remoção por meio

das técnicas de controle do biofilme utilizadas pelo paciente (Dalwai et al., 2006; Palmer et al., 2006).

2.2.2 Periodontite

Uma significativa porcentagem da população sofre de periodontite, uma doença inflamatória crônica caracterizada pelo desarranjo dos tecidos periodontais (Kumagai et al., 2005).

Na periodontite crônica, o curso de progressão é lento a moderado, porém períodos de destruição mais rápida podem ser observados. Aumentos na velocidade da progressão da doença bem como sua gravidade podem ser causados pelo impacto de fatores locais, sistêmicos ou ambientais que influenciam a interação normal hospedeiro-bactéria. Fatores locais podem influenciar o acúmulo de biofilme; doenças sistêmicas como o diabetes melito e a infecção pelo HIV podem influenciar a defesa do hospedeiro, e fatores ambientais, como cigarro e estresse, também podem alterar a resposta do hospedeiro ao acúmulo de biofilme (Newman et al., 2007).

A periodontite crônica pode ocorrer como doença localizada quando menos de 30% das áreas avaliadas demonstram perda óssea e de inserção, ou como uma doença generalizada quando mais de 30% das áreas estão afetadas. A doença também pode ser descrita como discreta, moderada ou grave, com base na quantidade de perda de inserção (Newman et al., 2007).

A resposta gengival imune tem sido associada com a patogênese, severidade e susceptibilidade genética para a doença periodontal (Hart et al., 2004).

2.3 Fibroblasto

É o mais abundante tipo celular no tecido conjuntivo gengival (Bykov, 2004). Tem origem mesenquimal e quando em quiescência possui núcleo fusiforme picnótico, densamente corado e com pouco citoplasma, e quando ativo, como no ligamento periodontal, tem núcleo ovóide, palidamente corado e muito citoplasma. Visto ao microscópio eletrônico, o fibroblasto ativo possui complexos de Golgi exuberante e grande quantidades de retículo endoplasmático granular, mitocôndrias e vesículas de secreção, indicativo das funções sintéticas e secretoras de uma célula ativa (Newman et al., 2007).

O fibroblasto tem papel principal no desenvolvimento, manutenção e reparo do tecido conjuntivo gengival. Assim como no tecido conjuntivo de outros lugares do corpo, os fibroblastos sintetizam colágenos e fibras elásticas, bem como glicoproteínas e glicosaminoglicanas. Os fibroblastos também regulam a degradação de colágeno através da fagocitose e secreção de colagenases (Arora et al., 1999).

Os fibroblastos gengivais e os fibroblastos do ligamento periodontal possuem fenótipos diferentes. A população de fibroblastos do ligamento periodontal apresenta atividade da fosfatase alcalina semelhante à dos osteoclastos. Os fibroblastos gengivais podem produzir uma série de citocinas pró-inflamatórias e também expressam moléculas de adesão em resposta a diversos padrões moleculares associados aos patógenos (Newman et al., 2007).

Nos tecidos de granulação da gengivite e periodontite bem como nas feridas, os fibroblastos desempenham importante função na recomposição e cicatrização dos tecidos (Smith, Martinez, 2006).

Na periodontite, a heterogeneidade dos fibroblastos atualmente é uma

característica bem estabelecida. Apesar do significado clínico e biológico de tal heterogeneidade ainda não ser claro, parece que ela é necessária para o funcionamento normal dos tecidos na saúde, na doença e no reparo (Newman et al., 2007).

2.4 Miofibroblastos

Miofibroblastos são células originadas de fibroblastos com características comuns a fibroblastos e células musculares lisas (Gabbiani, 1990, 1992; Rice, 2003; Hinz, 2007). São células caracterizadas pela expressão da isoforma α -AML que, quando ativadas, sintetizam altos níveis de matriz extracelular, particularmente o colágeno (Gabbiani, 1998, 1999; Desmoulière et al., 2005). Também são conhecidas como “fibroblastos ativos” por sua grande produção de matriz extracelular (Ina et al., 2005).

A denominação miofibroblastos foi proposta por Gabbiani et al. (1971), para células com formato fusiforme encontradas no tecido de granulação de feridas em cicatrização e que exibiam proeminentes feixes de microfilamentos citoplasmático (Oda et al., 1998; van Beurden et al., 2005).

O miofibroblasto é definido essencialmente pela ultraestrutura como uma célula altamente diferenciada com organelas especializadas (Gabbiani, 1999; Serini, Gabbiani, 1999; Desmoulière et al., 2004; Fang et al., 2005). Apresentam feixes de microfilamentos com corpos densos correndo em paralelo ao longo eixo axial do citoplasma (fibras de stress), especializações de membrana (fibronexus) onde os microfilamentos de actina ligam-se a domínios de fibronectina extracelular por meio de integrinas, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem

desenvolvidos, vesículas pinocíticas, junções intermediárias intercelulares, junções tipo “gap” e adesões focais bem desenvolvidas. O núcleo é em forma de “V” (chanfrado ou endentado), o que revela segmentos estrangulados, uma característica que reflete a contração celular, contendo cromatina fina e granular e nucléolo. São ainda geralmente envoltos por uma importante quantidade de matriz extracelular (Gown, 1990; Schürch et al., 1998; Gabbiani, 1999; Gabbiani, 2003; Eyden, 2004).

De todos os seus constituintes, três elementos morfológicos essenciais definem o miofibroblasto. São eles: a) as fibras de stress, comumente localizadas abaixo da membrana celular; b) as adesões focais (fibronexus), isto é, os sítios de ligação célula-matriz extracelular, bem desenvolvidas; c) junções “gap” e junções tipo intermediárias extracelulares (Lopes, 1999; Schürch et al., 1998).

Os miofibroblastos estão presentes em várias condições como no tecido de granulação, nos fenômenos de contração das feridas, cicatrizes hipertróficas, em algumas lesões caracterizadas por fibrose e retração como fibromatoses, cirrose hepática, pulmonar, renal e em condições neoplásicas e não-neoplásicas. Estão também presentes em condições fisiológicas em alguns tecidos como pele, ligamento periodontal, mucosa intestinal, septo alveolar pulmonar, cordão umbilical, nódulos linfáticos, fígado, baço e medula óssea, em geral em tecidos que necessitam contrair ou mesmo remodelar. A tensão tem sido mostrada ser um regulador crucial para o remodelamento do tecido conjuntivo. A fim de coordenar a distribuição dentro do tecido conjuntivo, contatos célula-matriz e contato célula-célula parecem ser essenciais (Gabbiani, 1992, 1998; Schürch et al., 1998; Hinz et al., 2004).

A população dos miofibroblastos foi estudada na cicatrização de feridas

em ratos por: a) contração do tecido de granulação; b) cobertura com retalho dividido de pele; c) cobertura com retalho de pele de espessura total. Nos três tipos de feridas, os miofibroblastos apareceram precocemente e alcançaram o pico na 2ª semana da cicatrização, sendo que nesse tempo, 40 a 50% dos fibroblastos tinham característica de miofibroblastos. A ferida com granulação contraiu rapidamente e completamente e teve longa persistência de miofibroblastos, que se distribuíam profundamente nessas feridas. Feridas recobertas por retalhos divididos de pele contraíram menos e tiveram diminuição mais rápida de miofibroblastos. As feridas com retalho total tiveram uma contração mínima e com muito rápida diminuição do número de miofibroblastos, até que na 4ª semana não havia miofibroblastos presentes. Retalhos de espessura total pareceram influenciar a contração da ferida, não por prevenir a formação de miofibroblastos, mas por acelerar a finalização do seu ciclo de vida (Rudolph et al., 1977).

Os miofibroblastos em feridas com tecido de granulação de porco têm seu ciclo de vida identificado em oito semanas de contração da ferida (Rudolph et al., 1977). Pelo microscópio eletrônico, fibroblastos com aparência contrátil de miofibroblastos tornam-se proeminentes depois de uma semana de tecido de granulação e persistem por 12 semanas, quando desaparecem (ou não são mais visíveis).

Estudos ultraestruturais mostram miofibroblastos com características de fenótipos heterogêneos em seu citoesqueleto, contendo filamentos intermediários, α -AML e miosina. Esta heterogeneidade também é relatada em estudos imunistoquímicos. Gabbiani (1992), em seu estudo "A biologia do miofibroblasto", verificou os fenótipos abaixo:

- a) fenótipo V - representam as células que expressam vimentina;

- b) fenótipo VA - representam as células que expressam vimentina e α - AML;
- c) fenótipo VAD - representam as células que expressam vimentina, α - AML e desmina;
- d) fenótipo VD - representam as células que expressam vimentina e desmina;
- e) fenótipo VA(D)M - representam as células que expressam vimentina, α - AML, cadeia pesada de miosina com ou sem desmina;
- f) fenótipos V, VA, VAD, VD e VA(D)M expressam no citoplasma isoformas β e λ de actina (Schürch et al., 1992, 1998).

O fenótipo do citoesqueleto dos miofibroblastos pode variar nos diferentes processos e localizações. Nos estudos de diversas patologias como fibrose pulmonar, renal, hepática, cicatrizes hipertróficas (Oda, 1988; Desmoulière, 2003) e na área de transição com o tecido fibroso inflamado (Yamasaki, 1987) nas quais os miofibroblastos estão presentes, têm sido descritos três processos fundamentais com diferentes fenótipos do citoesqueleto: a) diversas respostas para injúria e fenômenos reparativos; b) condições proliferativas; c) resposta do estroma para certas formas de neoplasias.

O 1º grupo inclui diversas respostas teciduais do tecido de granulação como intensas contraturas, sarcoidoses pulmonares, fibroses intersticiais de pulmão, escleroderma localizado e generalizado, placas ateroscleróticas, cirrose e leitos de úlceras isquêmicas. Os miofibroblastos dessas condições revelam fenótipos VA, alguns VAD e raramente VD e VA(D)M. Como referência especificamente ao tecido de granulação, os miofibroblastos são mais numerosos e mais desenvolvidos na

camada celular exsudato-produtiva (Schürch et al., 1998).

Análise das proteínas do citoesqueleto revela que, em experimentos com animais (Schürch et al., 1998), os miofibroblastos da cicatrização de feridas normais não expressam desmina ou cadeia pesada de miosina de músculo liso durante o fechamento da ferida; no tecido de granulação jovem, os miofibroblastos são pobremente desenvolvidos e são representados por células de fenótipos V. Do 5º ao 8º dia, os miofibroblastos expressam α -AML (fenótipo VA) e são numerosos e decrescentes, mostrando microtendões, junções intercelulares intermediárias e junções tipo “gap”. Os miofibroblastos do tipo VA, logo após, desaparecem gradualmente e não são mais detectados depois do 30º dia, indicando que os miofibroblastos de fenótipo VA aparecem temporariamente. A atividade contrátil dos miofibroblastos é cessada quando o fechamento da ferida é completado, diminuindo a expressão da α -AML, quando os miofibroblastos desaparecem pela ação da apoptose (Desmouliere et al., 1995). Além disso, as citocinas que estimulam a síntese da matriz extracelular são suprimidas, sugerindo a existência de um círculo de retroalimentação. Desvios nesse processo orquestrado poderiam possivelmente contribuir para o desenvolvimento de cicatrizes fibróticas, quelóides e outras reações proliferativas fibróticas (Hinz, 2007).

O 2º grupo inclui as fibromatoses (variantes músculo-aponeuróticas superficial e profunda) e outras proliferações do tecido mole como sarcoma, miosite proliferativa, histiocitoma fibroso cutâneo, dermatofibroma, elastofibroma dentre outros. Nessas condições, a proliferação de células revela uma ordem decrescente de fenótipos de citoesqueleto VA, VAD, VD, VA(D)M.

O 3º grupo consiste na resposta do estroma em neoplasias, principalmente nos carcinomas metastáticos e invasivos, especialmente aqueles

caracterizados por reação desmoplásica nos tecidos adjacentes. Em carcinomas *in situ*, miofibroblastos geralmente não são observados no estroma. Entretanto, a reação dos miofibroblastos ao redor de locais de alto grau de displasia em carcinomas *in situ* poderá começar antes da invasão do estroma mediada pelas citocinas. Essa interação estroma - epitélio em carcinomas incipientes é complexa e ainda merece muita investigação.

Nos carcinomas invasivos, os miofibroblastos não estão distribuídos uniformemente dentro do estroma. Em carcinomas mamários, por exemplo, eles tendem a ser mais numerosos dentro do estroma mesenquimal jovem, área que correspondem à invasão precoce do estroma ou mais consistentemente à invasão periférica celular de cada neoplasma. Isso denota a reação natural dessas células. A área esclerótica central de cada carcinoma é livre de miofibroblastos, possivelmente um reflexo da apoptose (Kellermann, 2007).

Originalmente, foi argumentado que, no câncer, a reação miofibroblástica do estroma representa uma resposta do hospedeiro possivelmente para conter neoplasmas invasivos. Em estudo com câncer de mama, foi mostrado que Lizil-Oxidase, uma enzima responsável pela estabilização da matriz extracelular (em cadeias cruzadas de colágeno e elastina), foi secretada pelas células do hospedeiro (mioepiteliais e miofibroblastos) ao redor do carcinoma *in situ*. Os estudos em Strasbourg e Copenhagen de Basset et al. (1990) entretanto, sugeriram que em carcinomas invasivos, os miofibroblastos secretam enzimas estromas-degradantes, as quais podem favorecer a invasão do câncer, e fatores de crescimento, os quais podem ativar o comportamento invasivo das células cancerígenas e controlar a angiogênese (Serini, Gabbiani, 1998; Funato et al., 1999).

A diferenciação do fibroblasto em miofibroblastos ocorre sob mudanças

do microambiente do tecido conjuntivo, causada por alguns agentes e/ou estimulantes. Nessas condições, o fibroblasto transforma-se em proto-miofibroblasto (Schmith et al., 1994), o qual é caracterizado pela formação de miofilamentos contendo somente as isoformas citoplasmáticas β e γ -actina, caracterizando dois tipos de miofibroblastos (Tomasek et al., 2002). Sob estímulo dos fatores de crescimento e uma nova síntese de componentes da matriz extracelular, o proto-miofibroblasto transforma-se em miofibroblasto, o qual é caracterizado pela expressão de α -AML e, em alguns casos, por marcadores de diferenciação de células de músculo liso como a desmina e miosina.

Dentre os principais fatores que governam o aparecimento e regressão dos miofibroblastos, as citocinas exercem um papel essencial (Gabbiani et al., 2003). As que mais influenciam a diferenciação dos miofibroblastos incluem: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF), Fator Estimulador de Colônias Granulócito-Mastócito (GM-CSF), Fator de Transformação de Crescimento beta-1 ($TGF-\beta_1$), Interferon Gama (γ -INF), Fator de Necrose Tumoral alfa ($TNF\alpha$), Interleucina 1 (IL-1) e Interleucina-2 (IL-2) (Schürch et al., 1998).

Nessa relação de citocinas, GM-CSF e $TGF-\beta_1$ têm um papel fundamental no recrutamento de células e na modulação de células para o fenótipo miofibroblástico, ou seja, na indução da expressão de α -AML nos fibroblastos quiescentes. Essa expressão α -AML é considerada o principal marcador bioquímico para a diferenciação miofibroblástica controlada em sistemas *in vitro*, além de sugerir que a expressão dessa isoforma de actina confere características contráteis às células fibroblásticas (Chambers et al., 2003; Hinz et al., 2003; Hinz, 2007).

Usualmente, a modulação do fibroblasto para miofibroblasto resulta da

combinação de três agentes diferentes: 1. Tensão mecânica; 2. TGF- β_1 e; 3. ED-A fibronectina celular (Arora et al., 1999; Gabbiani, 2003). E ainda, é requerida a desfosforilação dos resíduos da tirosina fosfatada (Ehrlich et al., 1999). E essa diferenciação pode ser inibida pela ação da nicotina, diminuindo a migração de células gengivais, reforçando a hipótese que a demora na cicatrização gengival em fumantes deve se ao fato da diminuição do número de miofibroblastos (Fang, Svoboda, 2005).

O TGF- β_1 é um fator de crescimento bem estudado que exerce importantes ações biológicas em fenômenos fisiológicos e patológicos. Nos fibroblastos, ele induz a produção de colágeno tipo I, e nos tecidos de granulação exerce duas principais atividades: capacidade de modificar a formação do tecido e formação e deposição de matriz extracelular, além de ser a citocina-chave para a evolução das lesões caracterizadas pela formação de fibroses e pela proteção dessas células contra o estímulo apoptótico (Chambers et al., 2003; Fan et al., 2007).

A transição entre fibroblasto e miofibroblasto é essencialmente devido à ação combinada de uma variante de ED-A fibronectina celular e TGF- β , particularmente o TGF- β_1 . Este miofibroblasto diferenciado sofre influência do Fator de Crescimento Fibroblástico e Heparina (FGF/h) induzindo-o a perder a expressão α -SMA e a se diferenciar novamente em fibroblastos, formando um ciclo vicioso (Dugina et al., 2001; Greenberg et al., 2006).

Funato et al. (1999) avaliaram o papel do TGF- β_1 e do Fator de Crescimento Fibroblástico básico (bFGF), que estão entre os mais importantes moduladores do reparo tecidual, na diferenciação dos miofibroblastos e sua apoptose durante a cicatrização seguida da injúria mucoperiosteal no palato de rato.

Para isso, realizaram análise imunistoquímica para α -AML ou bandas de DNA. Células positivas para TGF- β_1 foram notadas na região subepitelial do 2º ao 14º dia de injúria quando as feridas estavam completamente re-epitelizadas. A forte expressão do bFGF foi observada principalmente nos macrófagos e monócitos no local no 10º ao 14º dia depois da injúria. Durante a última fase de cicatrização, TGF- β_1 e bFGF mostraram uma baixa significância em número; além disso, o número de miofibroblastos expressando α -AML aumentou (pico 14º dia) e decresceu gradual e paralelamente (a apoptose dos miofibroblastos foi proeminente no 14º dia). Esses resultados mostram que o TGF- β_1 e o bFGF podem ser potenciais estimuladores da apoptose dos miofibroblastos depois da re-epitelialização em processo de reparação

Apoptose é um importante evento para a manutenção da homeostasia dentro da contínua renovação de tecidos como a pele e mucosa oral (Funato et al., 1999) podendo seu curso ser alterado pela interação intercelular e interação célula-matriz. A regulação do fenômeno da apoptose durante a cicatrização da ferida também é importante no estabelecimento e desenvolvimento das cicatrizes patológicas, sendo a fibrose tecidual resultado de uma série complexa de eventos focados na regulação da proliferação de fibroblastos, síntese e deposição de matriz extracelular bem como a própria apoptose, onde ocorre uma diminuição da população de miofibroblastos na fase de maturação cicatricial (Arora, McCulloch, 1999).

Quando uma cicatriz desenvolve dentro do tecido de granulação, os miofibroblastos desaparecem, provavelmente como resultado da apoptose, e a cicatriz classicamente torna-se menos celular composta por fibroblastos típicos com retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e não mais com microfilamentos (Gabbiani, 1992). Com a desregulação desse ciclo, inicia-se um mecanismo que

pode levar ao desenvolvimento de uma condição fibrótica, de cicatriz excessiva ou de doenças fibrocontráteis onde os miofibroblastos persistem (Desmouliere 1995, 1999; Bitu et al., 2006; Helary et al., 2006; Hinz, 2006).

2.5 Proteínas Miogênicas

2.5.1 α -actina de músculo liso

A actina faz parte de uma família de microfilamentos de 5-8nm de diâmetro que compõe o citoesqueleto e está presente em mamíferos e aves em pelos menos seis isoformas, sendo duas isoformas não-musculares e quatro isoformas musculares. As duas isoformas não-musculares ou citoplasmáticas são encontradas em praticamente todas as células e são denominadas β e γ -actinas. As quatro isoformas musculares, α -actina muscular cardíaca, α -actina muscular esquelética, α -AML e γ -AML, estão presentes em vertebrados superiores, não apresentando diferenças entre as espécies (Novikoff, Holtzman, 1997).

As actinas não-musculares estão envolvidas em processos como movimentação de cromossomos, fagocitose, exocitose, motilidade celular e manutenção estrutural, e estão localizadas inclusive em núcleo. As actinas musculares fazem parte do aparato contrátil das células musculares e células com fenótipo muscular, como as células mioepiteliais e miofibroblastos, e participam da contração celular.

A isoforma α -AML está presente em todos os tecidos musculares lisos de mamíferos, nas células mioepiteliais e nos miofibroblastos. Anticorpo monoclonal específico contra essa isoforma reconhece especificamente estas células, sendo negativas para outras formas de actina (β e γ) expressas em várias outras células

epiteliais e não-epiteliais.

2.5.2 Calponina

É uma proteína de aproximadamente de 34KDa, com variação da massa molecular conforme o tecido e a espécie em que se encontra. Quatro isoformas foram identificadas, sendo três codificadas por genes distintos e uma resultante de “*splicing*” alternativo. O gene calp h1 deriva a calponina h1 ou calponina básica ou calponina- α (23.333 Da), que é expressa exclusivamente em músculo liso e é a mais compreendida. A calponina (28.127 Da) é também derivada do gene h1 e detectada em músculo liso do trato urogenital, também de pH básico. As isoformas calponina h2 (neutra) e calponina ácida (36.377 Da) exibem consideráveis seqüências de aminoácidos idênticas à calponina h1 e são expressas em células musculares lisas e não musculares, incluindo cérebro, mas suas propriedades funcionais são distintas da isoforma muscular lisa (Hodgkinson et al., 1997).

A isoforma muscular lisa tem sido proposta como uma proteína reguladora da contração dos músculos lisos, ou seja, da interação actina-miosina, no que diz respeito à velocidade e intensidade. Essa proteína liga-se à actina, porém as vias que controlam a calponina e o seu papel exato na regulação do ciclo de interligações entre actina e miosina não são totalmente claros. A denominação calponina reflete sua habilidade de ligar-se ao cálcio-calmodulina e ter reação com anticorpo anti-troponina A (El-Mezgueldi et al., 1992).

Além de um possível papel na regulação da interação actina-miosina, a calponina pode também ter função na organização e regulação estrutural do citoesqueleto, pois alguns dados indicam que ela pode estar presente não apenas

no aparato contrátil, mas também no citoesqueleto. E se a calponina realmente desempenha um importante papel na formação do citoesqueleto, o mesmo pode supor que ela também seja capaz de interagir não somente com proteínas dos microfilamentos, mas com diferentes proteínas dos microtúbulos e filamentos intermediários (Gusev, 2001).

Ela é quase que exclusiva de tecido muscular liso e células com fenótipo muscular liso, sendo relatada em células mioepiteliais normais e neoplásicas e, embora apenas raramente, também em miofibroblastos (Korenbaum, Rivero, 2002). A expressão da calponina está possivelmente relacionada à diferenciação de células musculares lisas e é expressa, apenas em células que exibem fenótipo contrátil, deixando de ser expressa quando a célula entra em divisão.

2.5.3 Desmina

A análise eletroforética das fibras musculares lisas demonstrou que elas são compostas por duas proteínas principais: a actina e uma proteína de peso molecular entre 50 - 54 KDa e 470 aminoácidos, denominada desmina. Estudos imunológicos e bioquímicos demonstram que a desmina é também componente do músculo esquelético e cardíaco bem com de células endoteliais de mamíferos e aves. Entretanto, a desmina das duas classes mostra diferentes pontos isoelétricos, diferentes pesos moleculares sendo a de mamíferos mais ácida (Machado, Figueredo, 1996).

Foi purificada em 1977 por Small & Sobieszek, que a chamaram de “esqueletina”. Lazarides & Hubbard (1976) purificaram-na denominando de “desmina” (desmo = ligação) por conferirem a ela, a função de ligação com os

sarcomêros (miofibrila muscular). Seu gene foi identificado por Capetanaki et al. (1984).

Tem sido mostrada a interação da desmina com algumas moléculas, e funções particulares são atribuídas a cada uma dessas interações. Aspectos da biologia celular são notáveis, como sua resistência à desnaturação química, estabilização mecânica e sua interação direta com o programa de diferenciação muscular (Costa, Figueredo, 2004). A desmina é uma das primeiras proteínas estruturais específicas de músculo e uma das mais persistentes em algumas condições de diferenciação.

2.5.4 Miosina

Miosina é uma família de diversas moléculas motoras que utiliza energia do ciclo de ATP para executar trabalho mecânico (contração muscular) juntamente com os filamentos de actina (Olivares, De La Cruz, 2005). São os principais componentes dos miofilamentos e consistem em, no mínimo, 20 classes estruturais e funcionalmente distintas. O genoma humano contém aproximadamente 40 genes de miosina, dos quais 12 estão codificados.

É formada por duas cadeias polipeptídicas pesadas e quatro leves. As cadeias pesadas formam uma dupla hélice deixando livres nas extremidades estruturas globulares denominadas cabeças de miosina. As quatro cadeias leves localizam-se na cabeça da miosina, duas em cada cabeça. O corpo da molécula de miosina forma a cauda do microtúbulo e dela saem proeminências helicoidais que mantêm a cabeça longe do corpo, chamado de braço da molécula. O conjunto formado chama-se ponte cruzada. Esta proteína motora movimenta-se ao longo dos

filamentos de actina utilizando ATP.

A miosina tem sido implicada em uma variedade de outras funções intracelulares, incluindo migração e adesão celular; transporte e localização de organelas e macromoléculas; sinal de transdução e supressão de tumor (Krendel, Mooseker, 2005).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a presença de miofibroblastos em gengiva normal, gengivite e periodontite através da técnica de imunohistoquímica utilizando os anticorpos α -actina de músculo liso, calponina, miosina e desmina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para esse estudo, foram utilizados fragmentos de mucosa bucal diagnosticado clínica e histologicamente como gengiva normal, gengivite e periodontite obtidos de diferentes áreas da gengiva fixados em formol 10% e emblocados em parafina. Para cada grupo das lesões citadas foram selecionados 10 casos pertencentes ao arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de odontologia e Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic.

Esta pesquisa foi submetida à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição e aprovada Parecer nº 06/262.

Foram realizadas reações imunoistoquímicas com os anticorpos monoclonais α -actina de músculo liso (AML) (clone 1A4, Dako, Carpinteria, CA, USA) calponina (clone CALP, Dako), miosina (clone SMMS-1, Dako) e desmina (clone DE-R-11, Dako), com o protocolo abaixo descrito:

- a) cortes dos blocos de parafina contendo os espécimes em 3 μ m de espessura;
- b) desparafinização dos cortes em dois banhos de xilol: o primeiro a 60° por 30 minutos e o segundo a temperatura ambiente por 20 minutos;
- c) rehidratação em uma série de etanol em concentrações decrescentes: três banhos em etanol absoluto, um em etanol 95% e um em etanol 85%, durante três minutos cada;
- d) lavagem em água corrente por 5 minutos e três passagens em água destilada;

- e) recuperação antigênica para os anticorpos calponina, miosina e desmina (tabela 1);
- f) passagem em água destilada três vezes;
- g) bloqueio da peroxidase endógena tecidual com imersão do material em peróxido de hidrogênio a 20% e metanol na proporção de 1:1 em três banhos de cinco minutos cada;
- h) lavagem em água corrente por 10 minutos e passagem posterior em água destilada;
- i) dois banhos com a solução tampão de TRIS 0,05M pH 7,4 por cinco minutos cada.

Após esse preparo, as lâminas seguiram para processamento mecânico na *DakoCytomation Autostainer* onde os seguintes passos foram realizados:

- a) incubação dos anticorpos primários (AML, calponina, miosina e desmina) diluídos em BSA 1% na concentração e tempo descritos na tabela 1;
- b) dois banhos com a solução tampão de TRIS 0,05M pH 7,6, por cinco minutos cada;
- c) incubação do anticorpo secundário LSAB + System-HRP (cód. K069, Dako) por 30 minutos;
- d) dois banhos com a solução tampão de TRIS 0,05M pH 7,6, por cinco minutos cada;
- e) incubação do complexo terciário LSAB + System-HRP (cód. K069, Dako) por 30 minutos;

- f) dois banhos com a solução tampão de TRIS 0,05M pH 7,6, por cinco minutos cada;
- g) revelação da reação com DAKO Liquid DAB plus (cód. K3468, Dako);
- h) lavagem com tampão de TRIS 0,05M pH 7,6.

Em seguida, as lâminas foram retiradas da máquina e seguiram manualmente os seguintes passos:

- a) lavagem em água corrente por 10 minutos seguidos de passagem em água destilada;
- b) contra-coloração com hematoxilina de Mayer por seis minutos;
- c) lavagem em água corrente por 5 minutos seguidos de passagem em água destilada;
- d) desidratação em uma série de etanol em concentrações crescentes (80%, 95% e 100%);
- e) diafanização em xilol;
- f) montagem em Permount®;
- g) análise dos resultados em microscópio de luz.

Para controle negativo, os anticorpos primários foram suprimidos da reação e a parede muscular de vasos sanguíneos foram usados como controle interno positivo.

Tabela 1 - Clone, concentração, tempo de incubação e tratamento para recuperação antigênica dos anticorpos primários

Anticorpo	Clone	Concentração	Tempo de incubação	Recuperação Antigênica
α -Actina de músculo liso*	1 A4	1:300	40'	Sem tratamento
Calponina*	Ccalp	1:50	40'	Pepsina 0,4% pH1,8 em estufa a 37°C por 60 minutos Pepsina 0,1% pH1,8 em estufa a 60°C por 10 minutos seguido por estufa a 37°C por 10 minutos e Ac cítrico 0,1M pH6,0 em banho Maria a 95°C por 30 minutos
Miosina*	SMMS-1	1:50	60'	Ácido cítrico 0,1M pH 6,0, em banho Maria a 95°C por 20 minutos
Desmina*	DE-R-11	1:100	30'	

*Dako, Carpinteria, CA, USA

5 RESULTADOS

Neste trabalho, foi estudada a presença de miofibroblastos na gengiva normal, gengivite e periodontite por meio da expressão imunohistoquímica da actina de músculo liso (AML), calponina, miosina e desmina.

As gengivas normais, ao exame microscópico, apresentaram revestimento epitelial estratificado pavimentoso queratinizado em continuidade com epitélio pavimentoso não estratificado de poucas camadas (epitélio sulcular). A lâmina própria era constituída por tecido conjuntivo denso e raras células inflamatórias mononucleares, linfócitos e plasmócitos, estavam presentes especialmente nas proximidades do epitélio.

Nos casos de gengivite e periodontite, graus variados de inflamação foram verificados entre os casos, sendo em sua maioria de intensidade moderada. O infiltrado inflamatório foi predominantemente linfo-plasmocitário, concentrando-se nas proximidades do epitélio sulcular (figura 1a e figura 1d).

Dos 30 casos estudados (10 gengivas normais, 10 gengivites e 10 periodontites), apenas 2 casos de gengivite e 2 de periodontite apresentaram miofibroblastos positivos para AML (figuras 1b, 1c, 1e, 1f). Os demais anticorpos utilizados, calponina, desmina e miosina foram negativos em todos os casos.

Nos casos positivos, apenas raros miofibroblastos estavam presentes, sendo em quantidade discretamente maior nas periodontites. Os miofibroblastos localizavam-se abaixo das áreas inflamadas, entremeados a fibras colágenas dispostas em feixes espessos e paralelos.

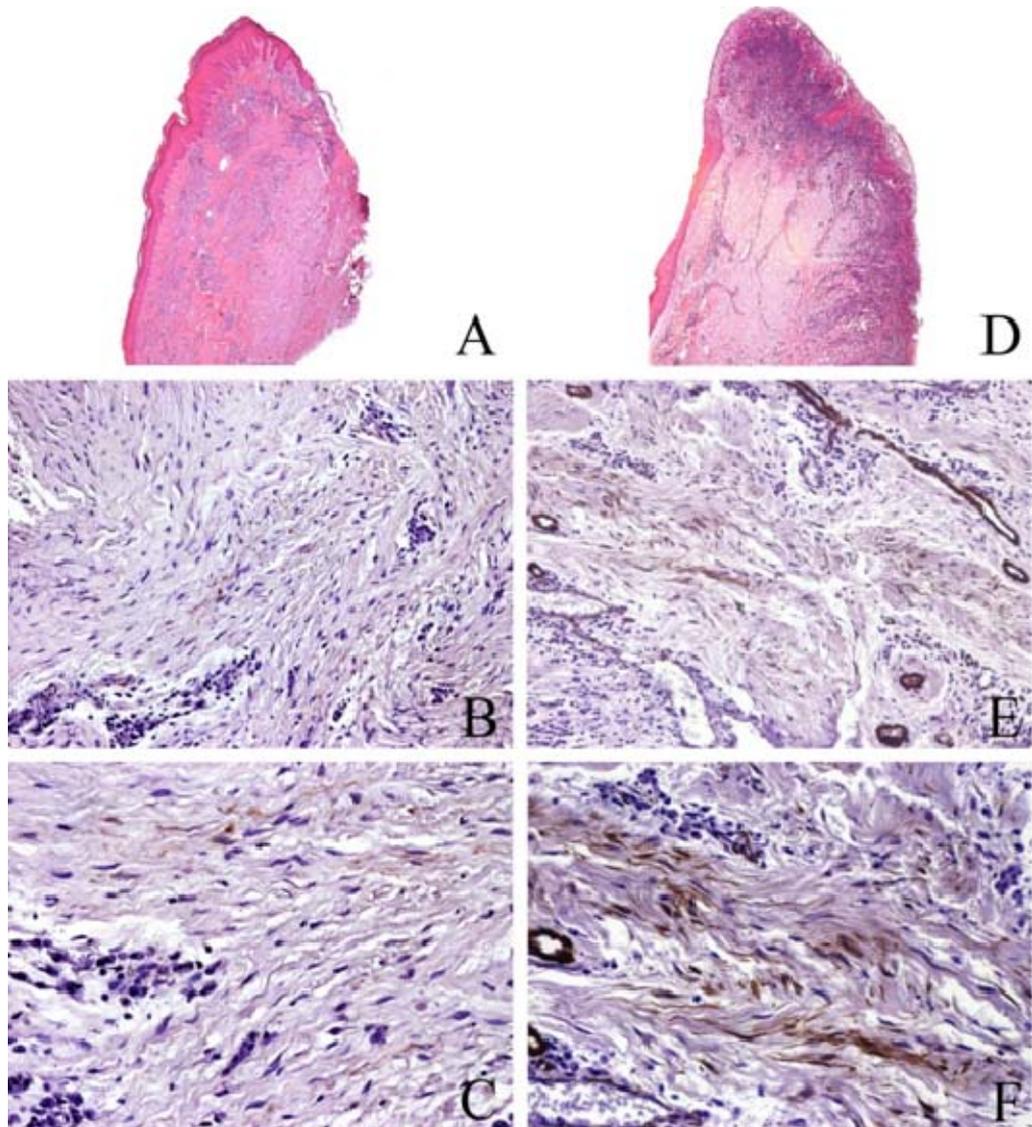


Figura 1- a, b e c: cortes histológicos de gengivite. d, e e f: cortes histológicos de periodontite. a: coloração de hematoxilina e eosina (aumento de 40x); b e c: imunomarcção de raros miofibroblastos pela α -actina de músculo liso (aumento de 200x e 400x); d: coloração de hematoxilina e eosina (aumento de 40x); e e f: imunomarcção de alguns miofibroblastos pela α -actina de músculo liso (aumento de 200x e 400x).

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram presença de miofibroblastos em apenas 20% (2 casos de cada) das gengivites e periodontites analisadas, mostrando-se discretamente em maior quantidade nas periodontites, estando ausentes em todos os espécimes de gengiva saudável. Dentre os marcadores miogênicos utilizados, os miofibroblastos foram evidenciados apenas com a α -actina de músculo liso (AML), sendo negativos para calponina, miosina e desmina. Além de estarem presentes em poucos casos, os miofibroblastos eram escassos e distribuídos na profundidade dos espécimes e em áreas fibrosas livre de inflamação.

A doença periodontal é uma das patologias crônicas mais prevalentes da raça humana e pode levar à destruição dos tecidos de suporte do dente bem como à perda do próprio dente (Kumagai et al., 2005). A gengivite é a inflamação da gengiva resultante principalmente de uma deficiente higiene oral, que permite o acúmulo de biofilme dental (Dalwai et al., 2006). Com a sua evolução, ocorre um agravamento do quadro, conhecido como periodontite, que é caracterizada pela destruição do ligamento periodontal com conseqüente formação de bolsas periodontais e reabsorção do processo alveolar, tendo o próprio mecanismo de defesa do hospedeiro contribuindo para sua etiologia (Hart et al., 2004).

Em alguns processos, tanto de natureza inflamatória, reativa ou neoplásica, o fibroblasto, sob influência de citocinas e fatores de crescimento, diferencia-se em miofibroblasto (Schürch et al., 1998; Tomazek et al., 2002; Gabbiani, 2003; van Beurden et al., 2005). Miofibroblastos são células que compartilham características ultraestruturais com fibroblastos e células musculares

lisas (Gown, 1990; Oda et al., 1998; Estes et al., 1994), apresentando capacidade de contração e de síntese de elevados níveis de colágeno (desmoplasia), bem como outros componentes da matriz extracelular, citocinas, fatores de crescimento, mediadores inflamatório e proteínas de adesão (Desmoulière et al., 2004; Kellerman, 2007).

O miofibroblasto foi inicialmente descrito no tecido de granulação de feridas em cicatrização por Gabbiani et al. (1971) e, posteriormente, seu papel ativo na cicatrização de feridas foi verificado (Rudolph, 1977). É geralmente aceito que os miofibroblastos apresentam um papel chave na reconstrução fisiológica do tecido conjuntivo depois da injúria e nas deformidades patológicas que caracterizam as doenças fibróticas (Estes et al., 1994; Gabbiani et al., 2003; Desmoulière et al., 2004; Hinz, 2007). Em nosso estudo, apenas poucos casos (2 casos de gengivite e 2 de periodontite) apresentaram miofibroblastos, que foram raros e em áreas focais. Entretanto, nenhum outro estudo foi conduzido nessas patologias.

Além do processo de cicatrização, os miofibroblastos estão também presentes em vários outros processos crônicos e fibróticos, no estroma de algumas neoplasias (Gown, 1990; Oda et al., 1998) e fisiologicamente no tecido conjuntivo em pequenas populações de muitos órgãos, como pele, ligamento periodontal, mucosa intestinal, septo alveolar pulmonar, estroma de duodeno, cordão umbilical, nódulos linfáticos, fígado, baço e medula óssea (Gabbiani, 1998, 1999; Schürch et al., 1998; Tomasek et al., 2002; Desmoulière et al., 2004; Hinz et al., 2004, 2007). Em nosso estudo, não foram encontrados miofibroblastos nos tecidos gengivais saudáveis, corroborando os achados de Kellerman (2007), que não verificou essas células na mucosa bucal normal. Nos tecidos normais, os miofibroblastos foram relatados particularmente em locais onde a força mecânica é necessária devido à

necessidade de contração ou mesmo remodelação uma vez que a tensão tecidual tem sido mostrada ser um regulador crucial para a diferenciação do fibroblasto para miofibroblasto e o remodelamento do tecido conjuntivo (Arora et al., 1999; Vaughan et al., 2000; Gabbiani, 2003; Hinz, Gabbiani, 2003; Helary, 2006), fato não requerido na mucosa bucal nem tampouco na gengiva, onde a contração tecidual promoveria a exposição no meio bucal da frágil junção amelo-cementária contra os ácidos bucais ou até da raiz dentária (Gabbiani, 1992, 1998; Schürch et al., 1998; Hinz et al., 2004).

O miofibroblasto é uma célula com diferenciação miogênica contendo um aparato contrátil que promove sua contração. A literatura tem mostrado, por meio de estudos ultraestruturais e imunistoquímicos, que o fenótipo do citoesqueleto dos miofibroblastos é heterogêneo, contendo filamentos intermediários, α -AML e miosina, nos diferentes processos e/ou localizações, podendo apresentar os seguintes constituintes: 1. apenas vimentina; 2. vimentina e AML; 3. vimentina, AML e desmina; 4. vimentina e desmina e; 5. vimentina, AML, cadeia pesada de miosina com ou sem desmina (Yamasaki, 1987; Gabbiani, 1992; Desmouliere et al., 1995; Schürch et al., 1998; Desmoulière, 2003). Nossos achados mostram miofibroblastos positivos apenas para AML, tanto na gengivite como na periodontite, assim como relatado por Schürch et al. (1998) em sua análise das proteínas do citoesqueleto, em que verificaram que os miofibroblastos da cicatrização de feridas normais em experimentos com animais não expressam desmina ou cadeia pesada de miosina de músculo liso durante o fechamento da ferida, apresentando apenas AML. Os miofibroblastos que apresentam fenótipo com desmina e/ou miosina são encontrados nas fibromatoses (variantes músculo-aponeuróticas superficial e profunda) e em algumas proliferações do tecido mole como sarcoma, miosite

proliferativa, histiocitoma fibroso cutâneo, dermatofibroma, elastofibroma dentre outros (Schürch et al., 1998).

Eyden (2003) considerou a desmina como um marcador para lesões miofibroblásticas, fato esse de particular interesse e contradição porque nos tecidos de granulação e no estroma tumoral, os miofibroblastos expressam muito pouco ou quase nada desse filamento intermediário. Desta forma, a desmina não deveria ser considerada como parte da definição primária dos miofibroblastos, embora a mesma seja reconhecida em algumas lesões.

Os estudos de Schürch et al. (1984) demonstraram que, nos miofibroblastos, há ausência de desmina e pré-queratina, apresentando somente um tipo de filamento intermediário, a vimentina, sugerindo que essas células são mais próximas dos fibroblastos que das células de músculo liso.

A calponina é uma proteína ligada à AML que age no controle da velocidade e intensidade da contração muscular. Embora os miofibroblastos apresentem AML, os miofibroblastos foram negativos para calponina tanto em nosso estudo como no de Mansur et al. (1996).

Outros marcadores como laminina, caldesmona e proteína de ativação de fibroblastos têm sido utilizados para caracterizar os miofibroblastos, mas o padrão de expressão é variável e dependente principalmente da origem, localização e condição patológica (Eyden, 2003; Kelermann, 2007). Gabbiani et al. (1998), Gabbiani (1998, 1999, 2003), Serini & Gabbiani (1999), Desmoulière et al. (2004, 2005) e Hinz et al. (2007) indicaram a AML como o melhor marcador para identificação dos miofibroblastos, por ser o elemento chave na diferenciação dos miofibroblastos, permitindo monitorar e identificar o comportamento destas células em situações clínicas e patológicas.

A diferenciação do fibroblasto em miofibroblastos ocorre sob mudanças do microambiente do tecido conjuntivo, causada por alguns agentes e/ou estimulantes. Nessas condições, o fibroblasto transforma-se em proto-miofibroblasto (Schmitt et al., 1994), o qual é caracterizado pela formação de miofilamentos contendo somente as isoformas citoplasmáticas β e γ -actina (Tomasek et al., 2001). Sob estímulo dos fatores de crescimento e uma nova síntese de componentes da matriz extracelular, o proto-miofibroblasto transforma-se em miofibroblasto, o qual é caracterizado especialmente pela expressão de α -AML e, em alguns casos, por marcadores de diferenciação de células de músculo liso como a desmina e miosina.

Dentre os principais fatores que governam o aparecimento e regressão dos miofibroblastos, as citocinas exercem um papel essencial (Gabbiani et al., 2001). As que mais influenciam a diferenciação dos miofibroblastos incluem: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF), Fator Estimulador de Colônias Granulócito-Mastócito (GM-CSF), Fator de Transformação de Crescimento beta-1 ($TGF-\beta_1$), Interferon Gama (γ -INF), Fator de Necrose Tumoral alfa ($TNF\alpha$), Interleucina 1 (IL-1) e Interleucina-2 (IL-2) (Shmit et al., 1994).

Nessa relação de citocinas, GM-CSF e $TGF-\beta_1$ têm um papel fundamental no recrutamento de células e na modulação de células para o fenótipo miofibroblástico, ou seja, na indução da expressão de α -AML nos fibroblastos quiescentes (Chambers et al., 2003; Hinz et al., 2003; Desmoulière et al., 2004, 2005; Hinz, 2007). O $TGF-\beta_1$ é um fator de crescimento bem estudado que exerce importantes ações biológicas em fenômenos fisiológicos e patológicos, atuando no crescimento e diferenciação de diferentes células e tecidos de modo a influenciar a síntese de componentes da matriz extracelular. Nos fibroblastos, ele induz

especialmente a produção de colágeno tipo I, e nos tecidos de granulação exerce duas principais atividades: capacidade de modificar a formação do tecido e formação e deposição de matriz extracelular, além de ser a citocina-chave para a evolução das lesões caracterizadas pela formação de fibroses e pela proteção dessas células contra o estímulo apoptótico (Serini et al., 1998; Chambers et al., 2003; Fan et al., 2007; Hinz, 2007).

A modulação do fibroblasto para miofibroblasto resulta da combinação de três agentes diferentes: 1. Tensão mecânica; 2. TGF- β_1 e; 3. variante ED-A de fibronectina (Tomasek et al., 2002; Gabbiani, 2003). E ainda, é requerida a desfosforilação dos resíduos da tirosina fosfatada (Ehrlich et al., 1999).

No presente estudo, em áreas onde o componente inflamatório estava presente, tanto na gengivite quanto na periodontite, não foram observadas deposição de colágeno nem presença de miofibroblastos, estando os miofibroblastos presentes em feixes fibrosos entremeados a essas regiões e localizado mais profundamente no espécime. No estudo de Sobral et al. (2004), os resultados mostram, também, que não havia miofibroblastos em áreas inflamadas do carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares de grau intermediário. Os autores sugeriram que o infiltrado inflamatório dessas áreas inibe a síntese de TGF- β_1 pela liberação de Interferon que promove a redução na síntese de RNAm da AML, interferindo na diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos. Ainda nesse estudo, outro fator considerado foi o próprio infiltrado inflamatório, no qual a presença dos macrófagos tem sido relacionada à diminuição da síntese de TGF- β_1 e à destruição da matriz extracelular. Nesta mesma relação, Hinz (2007) citou que miofibroblastos precoces podem ser suprimidos por fatores antagonistas liberados pelas células inflamatórias e também por queratinócitos.

Assim explica-se a presença de poucos miofibroblastos nos tecidos gengivais inflamados (gingivite e periodontite). Ainda, explica a sua localização mais na profundidade do espécime uma vez que as áreas mais inflamadas localizavam-se superficialmente, principalmente na região do sulco gengival, onde há maior ação dos microorganismos do biofilme e seus produtos, conforme mostrado nos resultados do nosso estudo.

A localização mais profunda dos miofibroblastos nos espécimes pode ter contribuído para a reduzida quantidade de casos positivos, pois se sabe que, em geral, a remoção dos fragmentos gengivais se faz o mais superficial possível a fim de minimizar os resultados anti-estéticos.

Nos casos analisados, notou-se, também, que as periodontites exibiram quantidade de miofibroblastos discretamente maior quando comparadas às gingivites, podendo ser justificado pela maior extensão e duração do processo, o que poderia estimular a diferenciação de maior quantidade de miofibroblastos.

E por fim, a pouca quantidade de casos exibindo miofibroblastos bem como a raridade dessas células nesses casos podem ser explicadas pelo processo de reparo na gengiva, que pode não apresentar tensão tecidual, co-requisito importante para a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos. Ou ainda, pode não requer contração do tecido uma vez que o comportamento do epitélio juncional frente ao processo infeccioso é afastar-se da fonte de agressão, o biofilme, e não se aproximar por meio da contração dos miofibroblastos.

O miofibroblasto apresenta ação antagonista no estroma. Assim como ele pode produzir grande quantidade de matriz extracelular, especialmente o colágeno tipo I, resultando na desmoplasia, alguns estudos em neoplasias sugerem que os miofibroblastos secretam enzimas que degradam a matriz extracelular (Schürch et

al., 1998; Serini et al., 1998). Estudos adicionais acerca da ação e função dos miofibroblastos nas patologias inflamatórias gengivais são necessários para maiores esclarecimentos.

7 CONCLUSÃO

Através deste trabalho podemos concluir que:

- a) não foram observados miofibroblastos em gengiva normal;
- b) apenas dois caso de gengivite e dois de periodontite apresentaram miofibroblastos;
- c) miofibroblastos foram evidenciados apenas com a α -actina de músculo liso.

REFERÊNCIAS¹

- Arora PO, McCulloch CA. The deletion of transforming growth factor - beta-induced myofibroblasts depends on growth conditions and actin organization. *Am J Pathol.* 1999 Dec;155(6):2087-99.
- Arora PO, Narani N, McCulloch CA. The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts. *Am J Pathol.* 1999 Mar;154(3):871-82.
- Bhawan J, Majno G. The myofibroblast. Possible derivation from macrophages in xanthogranuloma. *Am J Dermatopathol.* 1989 June;11(3):255-8.
- Bitu CC, Sobral LM, Kellermann MG, Martelli-Junior H, Zecchin KG, Graner E et al. Heterogeneous presence of myofibroblasts in hereditary gingival fibromatosis. *J Clin Periodontol.* 2006 June;33(6):393-400.
- Bykov VL. Cytological characteristics of the human periodontal. *Morfologia.* 2004;125(2):7-85.
- Capetanaki GY, Ngai J, Lazarides E. *Proc Natl Acad Sci.* 1984 Nov;vol 81:6909-13.
- Chambers RC, Leoni P, Kaminski N, Laurent GJ, Heller RA. Global expression profiling of fibroblast responses to transforming growth factor - beta1 reveals the induction of inhibitor of differentiation-1 and provides evidence of smooth muscle cell phenotypic switching. *Am J Pathol.* 2003 Feb;162(2):533-46.
- Costa ML, Escaleira R, Cataldo A, Oliveira F, Mermelstein CS. Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Braz J Med Biol Res.* 2004 Dec;37(12):1819-30.
- Dalwai F, Spratt DA, Pratten J. Modeling shifts in microbial populations associated with health or disease. *Appl Environ Microbiol.* 2006 May;72(5):3678-84.
- Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest.* 1990 July;63(1):21-9.
- Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen.* 2005 Jan-Feb;13(1):7-12.
- Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol.* 2004;48(5-6):509-17.
- Desmouliere A. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int.* 1995 May;19(5):471-6.
- Dugina V, Fontao L, Chaponnier C, Vasiliev J, Gabbiani G. Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *J Cell Sci.* 2001 Sept;114(Pt 18):3285-96.

¹ De acordo com o Manual de Normatização para Dissertações e Teses do Centro de Pós-Graduação CPO São Leopoldo Mandic, baseado no modelo Vancouver de 2007, e abreviaturas dos títulos de periódicos em conformidade com o Index Medicus.

Ehrlich HP, Keefer KA, Myers RL, Passaniti A. Vanadate and the absence of myofibroblasts in wound contraction. *Arch Surg*. 1999 May;134(5):494-501.

El-Mezgueldi M, Calponin. *Int J Biochem Cell Biol*. 1992;28:1185-89.

Estes JM, Berg JSV, Adzick NS, MacGillivray TE, Desmoulière A, Gabbiani G. Phenotypic and functional features of myofibroblasts in sheep fetal wounds. *Differentiation*. 1994;56:173-81.

Eyden B. Electron microscopy in the study of myofibroblastic lesions. *Semin Diagn Pathol*. 2003 Feb;20(1):13-24.

Fan L, Sebe A, Péterfi Z, Masszi A, Thirone ACP, Rotstein OD et al. Cell contact-dependent regulation of epithelial-myofibroblast transition via the rho-kinase-phospho-myosin pathway. *Mol Bio Cell*. 2007 Mar;18:1083-97.

Fang Y, Svoboda KK. Nicotine inhibits myofibroblast differentiation in human gingival fibroblasts. *J Cell Biochem*. 2005 Aug 15;95(6):1108-19.

Feugate JE, Li Q, Wong L, Martins-Green M. The cxc chemokine cCAF stimulates differentiation of fibroblasts into myofibroblasts and accelerates wound closure. *J Cell Biol*. 2002 Jan;156(1):161-72.

Funato N, Moriyama K, Shimokawa H, Kuroda T. Evidence for apoptosis induction in myofibroblasts during palatal mucoperiosteal repair. *J Dent Res*. 1999 Sept;78(9):1511-7.

Gabbiani G. Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept. *Cardiovasc Res*. 1998 June;38(3):545-8.

Gabbiani G. Some historical and philosophical reflections on the myofibroblast concept. *Curr Top Pathol*. 1999;93:1-5.

Gabbiani G. The biology of the myofibroblast. *Kidney Int*. 1992 Mar;41(3):530-2.

Gabbiani G. The cellular derivation and the life span of the myofibroblast. *Pathol Res Pract*. 1996 July;192(7):708-11.

Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*. 2003 July;200:500-3.

Galvão Filho S. *Dicionário odonto-médico inglês-português*. São Paulo: Santos; 1998.

Giannopoulou C, Cimasoni G. Functional characteristics of gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Dent Res*. 1996 Mar;75(3):895-902.

Gown AM. The mysteries of the myofibroblast (partially) unmasked. *Lab Invest*. 1990 July;63(1):1-3.

Greenberg RS, Bernstein AM, Benezra M, Gelman IH, Taliana L, Masur SK. FAK-dependent regulation of myofibroblast differentiation. *Faseb J*. 2006 May;20(7):1006-1008.

Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol*. 1994 Feb;124(4):401-4.

- Gusev NB. Some properties of caldesmon and calponin and the participation of these proteins in regulation of smooth muscle contraction and cytoskeleton formation. *Biochemistry (Mosc)*. 2001 Oct;66(10):1112-21.
- Hart GT, Shaffer DJ, Akilesh S, Brown AC, Moran L, Roopenian DC et al. Quantitative gene expression profiling implicates genes for susceptibility and resistance to alveolar bone loss. *Infect Immun*. 2004 Aug;72(8):4471-9.
- Helary C, Ovtracht L, Coulomb B, Godeau G, Giraud-Guille MM. Dense fibrillar collagen matrices: a model to study myofibroblast behavior during wound healing. *Biomaterials*. 2006 Sept; 27(25):4443-52.
- Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2003 June;14(6):2508-19.
- Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol*. 2003 Oct;14(5):538-46.
- Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol*. 2001 Sept;159(3):1009-20.
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Pliat MLB, Gabbiani G. Biological perspectives-the myofibroblast-one function-multiple origins. *Am J Pathol*. 2007;170(6):1807-16.
- Hinz B, Phan SP, Thannickal VJ, Galli A, Pliat MLB, Gabbiani G. Biological perspectives-the myofibroblast-one function,multiple origins. *Am J Pathol*. 2007 June;170(6):1807-16.
- Hinz B, Pittet P, Smith-Clerc J, Chaponnier C, Meister JJ. Myofibroblast development is characterized by specific cell-cell adherens junctions. *Mol Biol Cell*. 2004 Sept;15(9):4310-20.
- Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol*. 2007 Mar;127(3):526-37.
- Hodgkinson JL, El-Mezgueldi M, Craig R, Vibert P, Marston SB, Lehan W. 3D image reconstruction of reconstituted smooth muscle thin containing calponin:Visualization of interactions between F-actin and calponin. *J Mol Biol*. 1977;273:150-9.
- Ina K, Kitamura H, Tatsukawa S, Miyazaki T, Abe H, Fujikura Y. Intracellular formation of collagen microfibrils in granulation tissue. *Exp Mol Pathol*. 2005;79:244-48.
- Kellermann MG. Miofibroblastos são freqüentes no estroma e no fronte invasivo dos carcinomas espinocelulares orais onde controlam o comportamento tumoral por estimular a proliferação celular e a atividade da metaloproteinase de matriz 2 das células tumorais [tese]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas; 2007.
- Kernochan LE, Tran BN, Tangkijvanich P, Melton AC, Tam SP, Yee Junior HF. Endothelin-1 stimulates human colonic myofibroblast contraction and migration. *Gut*. 2002 Jan;50(1):65-70.

- Kilarski WW, Jura N, Gerwins P. An ex vivo model for functional studies of myofibroblasts. *Lab Invest.* 2005 May;85(5):643-54.
- Kissin E, Korn JH. Apoptosis and myofibroblasts in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep.* 2002 Apr;4(2):129-35.
- Korenbaum E, Rivero F. Calponin homology domains at a glance. *J Cell Sci.* 2002 Sept;115(Pt 18):3543-5.
- Krendel M, Mooseker MS. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda).* 2005 Aug;20:239-51.
- Kumagai Y, Yagishita H, Yajima A, Okamoto T, Konishi K. Molecular mechanism for connective tissue destruction by dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 2005 May;73(5):2655-64.
- Lazarides E, Hubbard BD. Immunological characterization of the subunit of the 100 A filaments from muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976 Dec;73(12):4344-8.
- Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. Traduzido por Edson Jorge Lima Moreira. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
- Lopes LA. Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potencia [tese]. S José dos Campos:Universidade Vale do Paraíba;1999.
- Machado GF, Figueiredo F. Revisão: filamentos intermediários. *Medicina (Ribeirão Preto).* 1996 jan-mar;29(1):104-13.
- Newman MG, Takeei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. Periodontia clinica. Traduzido por Nascimento RM. 10a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.
- North AJ, Gimona M, Cross RA, Small JV. Calponin is localised in both the contractile apparatus and the cytoskeleton of smooth muscle cells. *J Cell Sci.* 1994 Mar; 107(pt 3):437-44.
- Novikoff AB, Holtzman E. Célula estrutura celular. 2a ed. Rio de Janeiro: Interamericana; 1997.
- Oda D, Gown AM, Vande Berg JS, Stern R. The fibroblast-like nature of myofibroblasts. *Exp Mol Pathol.* 1988 Dec;49(3):316-29.
- Olivares AO, De La Cruz EM. Holding the reins on myosin V. *Proc Natl Acad Sei USA.* 2005 Sept;102(39):13719-20.
- Palmer Junior RJ, Diaz PI, Kolenbrander PE. Rapid succession within the *Veillonella* population of a developing human oral biofilm in situ. *J Bacteriol.* 2006 June;188(11):4117-24.
- Rice NA, Leinwand LA. Skeletal myosin heavy chain function in cultured lung myofibroblasts. *J Cell Biol.* 2003 Oct 13;163(1):119-29.
- Roche WR. Myofibroblasts. *J Pathol.* 1990 Aug;161(4):281-2.
- Rudolph R, Guber S, Suzuki M, Woodward M. The life of the myofibroblast. *Surg*

Gynecol Osbtet. 1977 Sept;145(3):389-94.

Schmitt-Graff A, Desmouliere A, Gabbiani G. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch.* 1994;425(1):3-24.

Schurch W, Seemayer TA, Gabbiani G. The myofibroblast: a quarter century after its discovery. *Am J Surg Pathol.* 1998 Feb;22(2):141-7.

Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L et al. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol.* 1998 Aug 10;142(3):873-81.

Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res.* 1999 Aug;250(2):273-83.

Sheffer Y, Leon O, Pinthus JH, Nagler A, Mor Y, Genin O et al. Inhibition of fibroblast to myofibroblast transition by halofuginone contributes to the chemotherapy-mediated antitumoral effect. *Moi Cancer Ther.* 2007 Feb;6(2):570-7.

Smith PC, Caceres M, Martinez J. Induction of the myofibroblastic phenotype in human gingival fibroblasts by transforming growth factor-beta1: role of RhoA-ROCK and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways. *J Periodontal Res.* 2006 Oct;41(5):418-25.

Smith PC, Martinez J. Differential uPA expression by TGF-beta1 in gingival fibroblasts. *J Dent Res.* 2006 Feb;85(2):150-5.

Sobral AP, Loducca SV, Nunes FD, Araújo NS, Kowalski LP, Araújo VC. Relationship between major and minor salivary gland mucoepidermoid carcinoma malignancy grading and presence of stromal myofibroblasts: immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med.* 2004 July;33(6):335-9.

Sobral LM, Montan PF, Martinelli-Junior H, Graner E, Colleta RD. Opposite effects of TGF- β 1 and IFN- γ on transdifferentiation of myofibroblast in human gingival cell cultures. *J Clin Periodontol.* 2007;34:397-406.

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 May;3(5):349-63.

Tomasek JJ, McRae J, Owens GK, Haaksma CJ. Regulation of alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts is dependent on the intronic CArG element and the transforming growth factor - beta 1 control element. *Am J Pathol.* 2005 May;166(5):1343-51.

Van Beurden HE, Von den Hoff JW, Torensma R, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Myofibroblasts in palatal wound healing: prospects for the reduction of wound contraction after cleft palate repair. *J Dent Res.* 2005 Oct;84(10):871-80.

Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. Transforming growth- β 1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res.* 2000 May;257(1):180-9.

ANEXO A - FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



SÃO LEOPOLDO MANDIC
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Aprovado pelo CEP

Campinas, 24 de Agosto de 2006.

A(o)

C. D. Cássio Guimarães

Curso: Mestrado em Patologia

Prezado(a) Aluno(a):

O projeto de sua autoria "ESTUDO DO MIOFIBROBLASTO NA GENGIVITE E PERIODONTITE".

Orientado pelo(a) Prof(a) Dr(a) Cristiane Furuse

Entregue na Secretaria de Pós-graduação do CPO - São Leopoldo Mandic, no dia 10/07/2006, com número de protocolo nº 06/262, foi APROVADO pelo Comitê de Ética e Pesquisa instituído nesta Universidade de acordo com a resolução 196 /1.996 do CNS - Ministério da Saúde, em reunião realizada no dia 20/07/2006.

Cordialmente

Prof. Dr. Thomaz Wassall
Coordenador de Pós-Graduação