

Cláudia Maria Navarro

**EFEITOS DA CICLOSPORINA A SOBRE A SÍNTESE DE
PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR DE FIBROBLASTOS
DE GENGIVA NORMAL E DE PORTADORES DE
FIBROMATOSE GENGIVAL HEREDITÁRIA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Biologia e Patologia Buco-Dental, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, Universidade
Estadual de Campinas-UNICAMP, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

Piracicaba

1996

N228e

27391/BC

*Este exemplar foi devidamente
conferido comforme resolucão CCPG 036/83
Piracicaba 20/03/96
Sergio*

Cláudia Maria Navarro

**EFEITOS DA CICLOSPORINA A SOBRE A SÍNTESE DE
PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR DE FIBROBLASTOS
DE GENGIVA NORMAL E DE PORTADORES DE
FIBROMATOSE GENGIVAL HEREDITÁRIA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Biologia e Patologia Buco-Dental, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, Universidade
Estadual de Campinas-UNICAMP, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

Orientador:

Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Piracicaba

1996

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	79C		
N.º CHAMADA	T/UNICAMP		
	Nº 228		
V.	E.		
1.º	2.º	3.º	4.º
667	96		
C	☐	D	☒
PREÇO	R\$ 11,50		
DATA	23/4/96		
N.º OPD			

CM-00087119-0

NAVARRO, C.M. Efeitos da ciclosporina A sobre a síntese de proteínas de matriz extracelular de fibroblastos de gengiva normal e de portadores de fibromatose gengival hereditária. Piracicaba, 1996. 114 p. Tese (Doutorado em Biologia e Patologia Buco-Dental) Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 15/03/96, considerou a candidata aprovada.

1. Sérgio Roberto Peres Line

A handwritten signature in cursive script, written over a horizontal line.

2. Oslei Paes de Almeida

A handwritten signature in cursive script, written over a horizontal line.

3. Lourenço Bozzo

A handwritten signature in cursive script, written over a horizontal line.

4. Maria Regina Sposto

A handwritten signature in cursive script, written over a horizontal line.

5. Gulnara Scaf

A handwritten signature in cursive script, written over a horizontal line.

**Ao Prof. Dr. Sérgio Roberto P. Line, por
ter estado sempre presente, orientando este
trabalho com dedicação e competência.
Pelo exemplo de integridade,
companheirismo e humildade.**

Vocês estarão sempre comigo...

Aos meus **AMIGOS**.

Aos meus pais, **ADILSON e DALVA**

Bolsa de Doutorado
CAPES/PICD - Auxílio deslocamento

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, e ao Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da mesma, pela oportunidade que nos foi concedida para a realização do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental na Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

À Profa. Dra. MARIA REGINA SPOSTO, Profa. Dra. MIRIAM A. ONOFRE e Profa. Dra. MARY ELENI S. F. M. MOTTA da Disciplina de Semiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, pelo apoio, tornando possível nosso afastamento durante o período necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. SÉRGIO ROBERTO PERES LINE, coordenador do Curso de Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

Aos companheiros da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba pela convivência que o tempo transformou em amizade.

Aos professores, alunos e amigos do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

À Dra. LUIZA L. VILLA e KATIA B. L. VIEIRA do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer e ao Prof. LOURENÇO BOZZO, pela obtenção das culturas primárias das linhagens de fibroblasto utilizadas.

Ao ADRIANO LUIS MARTINS, técnico do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo respaldo técnico durante a execução da fase experimental do trabalho.

À ANA CRISTINA DO AMARAL GODOY, técnica do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela colaboração recebida, principalmente durante a documentação fotográfica dos resultados.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

RESUMO	01
INTRODUÇÃO	03
REVISÃO DA LITERATURA	05
PROPOSIÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODOS	34
RESULTADOS	41
DISCUSSÃO	61
CONCLUSÕES	75
SUMMARY	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

RESUMO

RESUMO

A fibromatose gengival pode ser hereditária ou induzida por drogas. O padrão da doença sugere que os fibroblastos gengivais podem produzir grandes volumes de substância extracelular. Um dos efeitos colaterais da ciclosporina A (CsA) é a indução de fibromatose gengival. Os efeitos de 3 diferentes concentrações de CsA sobre a morfologia, síntese de collagenase, de fibronectina e atividade collagenolítica, foram estudados "*in vitro*" em 6 linhagens de fibroblastos, 3 de gengivas normais e 3 de fibromatose gengival hereditária. Os fibroblastos foram cultivados com meio contendo concentrações de 250, 500 e 1.000 ng/ml de CsA, por 24, 48 e 72 h.. O meio foi coletado e submetido a ensaios enzimográficos e de atividade collagenolítica. A síntese de fibronectina foi avaliada através de "dot blot" e de proteína total pela análise eletroforética do sobrenadante. As diferentes concentrações de CsA não alteraram a viabilidade celular. Após 72 h. com 1.000 ng/ml de CsA, todas as linhagens apresentaram alterações morfológicas. A determinação da densidade celular em câmara de Neubauer não revelou diferenças significativas na contagem celular das linhagens, quando incubadas com diferentes concentrações de CsA. O zimograma, sem incubação com CsA mostrou padrão heterogêneo na secreção de collagenase entre as linhagens, com maior atividade enzimática após 72 h.. As 6 linhagens responderam de forma semelhante frente às diferentes concentrações de CsA em relação à síntese de collagenase e fibronectina após 48 h.. Após 72 horas, a collagenase ativada com tripsina digeriu completamente o substrato de colágeno I. Os fibroblastos de gengivas normais como os de fibromatose gengival hereditária comportaram-se de forma semelhante em relação à

proliferação, síntese de colagenase, de fibronectina e atividade colagenolítica, independentemente da concentração da droga. Entretanto, houve uma variação no padrão do comportamento celular em relação à síntese de proteína total.

Palavras-chave: fibromatose gengival, ciclosporina A, fibroblastos gengivais.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A fibromatose gengival caracteriza-se por aumento gengival não inflamatório que interfere com a fala, selamento labial, mastigação e aparência facial. Pode ser hereditária ou decorrente de efeito colateral de drogas como fenitoína, valproato de sódio, primidone, nifedipina e ciclosporina A (CsA).

A síntese e a degradação de colágeno requerem regulação precisa. Em casos de fibromatoses, este delicado mecanismo de regulação está alterado. A síntese aumentada de colágeno, produção de colagenase em quantidade reduzida ou funcionalmente deficiente *in vitro*, e produção aumentada de inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP) podem levar à redução da atividade colagenolítica, e à densa deposição de colágeno, característica das fibromatoses gengivais (Hassell e cols., 1982; Tipton e cols., 1991). Tem sido sugerido que em vários casos de gengivas hiperplásicas, há alterações funcionais de fibroblastos *in vitro* envolvendo sua proliferação, atividade colagenolítica e síntese de matriz extracelular (Hou, 1993).

Na maioria dos estudos sobre matriz extracelular gengival, o interesse principal tem sido concentrado nos componentes colagenosos, sendo que pouco se conhece sobre proteínas não colagenosas como a fibronectina. Na gengiva, a fibronectina corresponde à principal glicoproteína sintetizada pelos fibroblastos, juntamente com o colágeno tipo I e III (Baum e Wright, 1981; Veron e cols, 1990).

Tem sido sugerido que a CsA possa ter ação direta sobre fibroblastos, alterando alguns aspectos funcionais como a proliferação e

a síntese de proteínas, no entanto, esta ainda é uma questão controvertida na literatura.

O objetivo deste trabalho foi analisar *in vitro*, a síntese de colagenase, de fibronectina, de proteína total e a atividade colagenolítica e a morfologia de fibroblastos de portadores de fibromatose gengival hereditária e de gengivas normais incubados com CsA em diferentes concentrações.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

FIBROMATOSE GENGIVAL HEREDITÁRIA

A fibromatose gengival hereditária é uma doença bucal rara, caracterizada por crescimento lento e progressivo com aumento não inflamatório da gengiva da maxila e mandíbula. O aumento tecidual sempre envolve completamente a gengiva e interfere marcadamente com a fala, selamento labial, mastigação e aparência facial (Shirasuna e cols., 1989).

Histologicamente, os tecidos gengivais afetados são compostos principalmente por tecido conjuntivo denso, rico em fibras colágenas, porém com poucos fibroblastos. O revestimento epitelial usualmente é normal, mas ocasionalmente podem ocorrer áreas hiperplásicas (Shirasuna e cols., 1989).

A etiologia da fibromatose gengival ainda não está bem determinada. Na grande maioria das famílias, demonstra ser herdada como característica autossômica dominante (Emerson, 1965; Witkop, 1971; Jorgeson e Cocker, 1974; Bozzo e cols., 1994) e, em poucas como herança autossômica recessiva (Witkop, 1971; Jorgeson e Cocker, 1974; Singer e cols., 1993).

A fibromatose gengival também pode ocorrer associada a outras anormalidades como hipertricose, epilepsia, esplenomegalia, oligofrenia e alterações esqueléticas (Laband e cols., 1964; Jorgeson e Cocker, 1974). Este aumento de volume tecidual tem sido associado a algumas síndromes, sendo que Kilpinen e cols. (1978) descreveram

uma família na qual 4 dos 8 filhos expressavam vários graus de fibromatose associada a retardo da erupção dos dentes permanentes e do crescimento esquelético. Além disso, o crescimento gengival estava presente nas gerações anteriores por parte materna, tendo sido relatada associação com ausência de características sexuais secundárias em algumas mulheres da família.

Estudos endocrinológicos sugeriram que neste caso, a associação entre o crescimento esquelético retardado e a fibromatose gengival era apenas coincidência (Collan e cols., 1982).

Em 1995, Wynne e cols. descreveram uma nova síndrome com padrão de herança autossômica dominante, em que a fibromatose gengival hereditária ocorre associada à perda de audição, presença de dentes suprenumerários e hipertelorismo.

O mecanismo bioquímico envolvido na fibromatose gengival hereditária ainda não está bem estabelecido, existindo poucos estudos e com resultados conflitantes (Collan e cols., 1982; Johnson e cols., 1986; Hou, 1993). Entretanto, o padrão clínico e histológico podem sugerir que a doença ocorra devido ao desenvolvimento anormal do tecido gengival contendo fibroblastos afetados que produzam anormalmente grandes volumes de substância extracelular (Shirasuna e cols., 1989).

O tecido conjuntivo das gengivas é composto por grupos de fibras colágenas estrutural e funcionalmente distintas. Estas fibras servem para suportar os dentes, prover forma e tonus aos tecidos, suportando as forças que incidem sobre os dentes. Gengivas normais

contém colágeno tipo I e III em grande quantidade, sendo que os tipos IV e V apresentam-se em quantidades bem menores (Page e cols., 1974; Narayanan e Page, 1983; Narayanan e cols., 1985; McCulloch e Bordin, 1991).

O tecido conjuntivo da mucosa bucal é composto de colágeno, elastina, proteoglicanas e glicoproteínas. O colágeno representa cerca de 60% das proteínas da matriz extracelular da gengiva humana saudável, constituindo uma família de proteínas estruturais, genética e funcionalmente distintas (Ballard e Butler, 1974; Bornstein e Sage, 1980; Chavrier e cols., 1984). O colágeno tipo I em relação do tipo III, ocorre na proporção de 7:1, e o colágeno tipo IV representa menos de 1% do colágeno presente (Nathan e cols., 1979).

FIBROMATOSE GENGIVAL INDUZIDA POR DROGAS

A fibromatose gengival pode ser uma condição hereditária ou pode ocorrer como efeito colateral de várias drogas como fenitoína, valproato de sódio, primidone, nifedipina e CsA (Angelopoulos, 1975; Syrjanen e Syrjanen, 1979; Rateitschak-Pluss e cols., 1983; Wisocki e cols., 1983; Ramon e cols., 1984; Rostock e cols., 1986).

A fibromatose gengival induzida por fenitoína ocorre mais comumente na região anterior do que na posterior, sendo que crianças e adolescentes tendem a apresentar alterações severas. De acordo com Dooley e Vasan (1989) a fibromatose gengival ocorre somente quando os dentes estão presentes, e nunca em áreas desdentadas, porém em situações inócuas ela pode ocorrer em pacientes desdentados (Dallas,

1963; Dreyer e Thomas, 1978; Darling e cols., 1986; Poppell e Collins, 1987; Bredfeldt, 1992).

Através do estudo da distribuição de fibronectina em gengivas com fibromatose induzida por nifedipina, Romanos e cols. (1993) sugeriram que a fibronectina desempenha importante papel na composição da matriz extracelular em tecidos normais, e seu estudo pode revelar alterações metabólicas que resultem em aumento de volume gengival.

McKevitt e Irwin (1995) estudando pacientes tratados com nifedipina, obtiveram resultados que fundamentaram o conceito de que nos aumentos gengivais induzidos por nifedipina, há fibroblastos susceptíveis aos efeitos desta droga. Entretanto, em relação ao crescimento celular e síntese de matriz extracelular, a nifedipina adicionada ao meio de cultura (1.000 ng/ml) exerceu um efeito inibidor sobre os fibroblastos obtidos de gengiva hiperplásica e, por outro lado, não exerceu qualquer efeito sobre os fibroblastos de gengiva normal.

FIBROMATOSE GENGIVAL E PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR

A síntese aumentada de colágeno, a produção reduzida de colagenase ou a produção aumentada de inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP) podem levar à diminuição da atividade colagenolítica, e todos estes mecanismos podem contribuir para a densa deposição de colágeno, característica dos aumentos gengivais fibromatosos (Tipton e cols., 1991).

Em vários estudos sobre fibromatoses, as evidências sugerem que há alteração da função dos fibroblastos *in vitro* incluindo a proliferação, colagenólise e síntese de matriz extracelular. A síntese e deposição excessivas de colágeno são características das fibroses, porém, o decréscimo da atividade colagenolítica pode também estar envolvido por defeitos na síntese de collagenase (Uitto e cols., 1981; Hassell, 1982).

Foi demonstrado em 1976, por Hassell e cols., que fibroblastos derivados de fibromatoses gengivais de indivíduos tratados com fenitoína sintetizam níveis elevados de proteínas, mas raramente alta porcentagem de colágeno. Em 1982, Hassell demonstrou que fibroblastos de indivíduos com fibromatose causada por fenitoína produziam grande quantidade de collagenase, no entanto, esta enzima era pouco eficiente para degradar colágeno *in vitro*, tendo observado variação substancial entre as linhagens em relação ao volume de collagenase sintetizada e secretada. Neste mesmo estudo, pode ser observado que a produção de collagenase pelos fibroblastos de gengivas normais e com fibromatose diminuiu à medida em que a monocamada se tornou mais densamente confluenta.

Os próprios fibroblastos que sintetizam a collagenase podem sintetizar inibidores da atividade colagenolítica (Bauer e cols., 1975), e portanto, é possível que fibroblastos originários de fibromatose gengival, além de collagenase, possam sintetizar níveis elevados de inibidores por serem células altamente ativas (Bauer e cols., 1975; Hassell, 1982).

De acordo com Tipton e cols. (1991) a observação de que nem todos os pacientes tratados com CsA desenvolvem fibromatose gengival, sugere que há uma heterogeneidade interindividual na resposta direta dos fibroblastos à CsA. Em 1988, HASSEL e cols. mostraram que linhagens de fibroblastos de diferentes indivíduos exibiram variação na síntese de proteínas em resposta à CsA.

Zebrowski e cols. (1988) relataram que a CsA nas concentrações de 250 a 500 µl/ml não exerce efeito sobre a atividade colagenolítica de fibroblastos gengivais humanos normais; e sugerem que a atividade colagenolítica não desempenha um papel significativo nos aumentos gengivais induzidos por drogas. De acordo com Tipton e cols. (1991) o efeito da CsA sobre a atividade colagenolítica aparentemente depende do doador da amostra, da presença de subpopulações celulares susceptíveis e da concentração da droga.

CICLOSPORINAS

A CsA é um metabólito isolado de duas espécies fúngicas, o *Trichoderma polysparum* e o *Cylindrocarpon lucidum* descrito inicialmente em 1976, com acentuada propriedade imunossupressora, tanto experimentalmente como clinicamente (Borel e cols., 1976). A CsA tem mais de 700 análogos, mas poucos têm atividade imunossupressora significativa. A ciclosporina G (CsG) ou Nva-2, é um análogo natural da CsA com forte atividade imunossupressora (McKenna e cols., 1989; Jeffery, 1991; Masri, 1992). Embora a

ciclosporina apresente muitos análogos, sem dúvida a CsA é a mais utilizada para promover a imunossupressão, principalmente em pacientes que receberam transplante de órgãos. Em alguns modelos animais, um curto tempo de administração da droga permite a sobrevivência prolongada ou indefinida do órgão transplantado vascularizado (Green e Allison, 1978; 1980; Reitz e cols., 1981; Morris, 1984). Além disso, desde 1978 tem sido usada em muitos pacientes que receberam transplantes, com melhores resultados quando comparada com a imunossupressão convencional. Para os transplantes de rim, a sobrevida pode ser aumentada em 25%, sendo que os transplantes de fígado podem ter a sobrevida duplicada (Starzl e cols., 1983). São relatados bons resultados para o transplante de coração associado a pulmão, no entanto, a CsA é menos efetiva para os transplantes de pâncreas e medula óssea (Oyer e cols., 1983; Sutherland e cols., 1983). Há evidências de que a imunossupressão por CsA não proporciona melhora significativa na sobrevivência de enxertos de pele (Towpik e cols., 1985).

A CsA também tem sido usada em outras áreas, particularmente no tratamento de psoríase, lupus, líquen plano, dermatites e artrite reumatóide. Mais recentemente, tem sido utilizada também na terapia da asma crônica, mieloma múltiplo, colite ulcerativa, doença de Crohn, enteropatia autoimune e doença hepática (Gupta e cols., 1989; Alexander e cols., 1989; Sonneveld e cols., 1992; Gajardo, 1993; Fry, 1994; Amerio e cols., 1994; Bos, 1994; Brechtel e cols., 1994; Kemény e cols., 1994; Treem e Hyam, 1994).

Mecanismo de ação

A CsA é um pequeno peptídeo, com peso molecular de 1203 d que atua seletivamente sobre as fases iniciais da estimulação linfóide. A resposta imunológica a um órgão transplantado depende dos linfócitos T iniciarem e manterem a imunidade mediada por células e anticorpos. Este composto afeta os processos onde estão envolvidas a imunidade humoral e celular. Experimentos *in vitro* e *in vivo* em várias espécies animais revelaram que a CsA atua sobre os linfócitos T imunocompetentes. Esta droga exibe ação altamente específica sobre células T sem causar mielossupressão (Borel e cols., 1977; Lillehoj e cols., 1984; Helin e cols., 1984; Bennett e Norman, 1986).

Na interação de células imunocompetentes e seus produtos, os macrófagos ativados por antígenos produzem uma monocina, a interleucina 1, que por sua vez estimula os linfócitos T auxiliares na síntese e liberação de uma linfocina, a interleucina 2, que promove a proliferação de linfócitos T citotóxicos sensibilizados, assim como a produção de γ interferon (Towpik e cols., 1985).

A CsA atua bloqueando a produção e a resposta à interleucina 2 (Lillehoj e cols., 1984; Elliot e cols., 1984). As linfocinas, fatores solúveis secretados pelos linfócitos e monócitos para estimular outras células, regulam a resposta imune ao órgão transplantado. A interleucina 2 promove expansão de clones de linfócitos efetores ativados por antígenos transplantados. Embora a CsA possa bloquear a produção de interleucina 2 por linfócitos T ativados, não afeta sua resposta à interleucina 2, portanto, a droga atua

precocemente na sequência de ativação imunológica (Kaufman e cols., 1984).

Muitas pesquisas têm mostrado que a CsA interage com múltiplas faoetas da resposta imunológica, inibindo seletivamente funções específicas dos linfócitos por restrição da expansão clonal e/ou ativação funcional de linhagens celulares imunocompetentes individuais (Leoni e cols., 1978). Embora a CsA afete tanto a resposta humoral como a resposta celular, sua principal ação é sobre a imunidade celular (Borel, 1976). A droga atua preferentemente sobre linfócitos T, podendo alterar o processo de reconhecimento antigênico e modular estágios iniciais de diferenciação destas células (White e cols., 1979). A CsA interfere especificamente com a indução de linfócitos T auxiliares e com a geração de linfócitos T citotóxicos, impedindo tanto a liberação de interleucina 1 como a 2. A CsA tem efeito modulador específico sobre o sistema imunológico, inibindo a produção e liberação de interleucina 2, sendo que para produzir o mesmo efeito sobre a interleucina 1 é necessária maior concentração de CsA (Powles e cols., 1980; Bunjes e cols., 1981; Palacios e Moller, 1981; Borel e Lafferty, 1983; Thamson e cols., 1983).

A CsA inibe indiretamente a função dos monócitos por supressão da produção de γ interferon (linfocina de células T), de fator inibidor de macrófagos e de fator quimiotático para macrófagos. Além disso, a produção de interleucina 1, que é um cofator para a ativação de linfócitos T auxiliares, é inibida em monócitos (Helin e cols., 1984; Granelli-Piperno e cols., 1984). A CsA bloqueia a produção de

interleucina 1, 2, fator de necrose tumoral (TNF), γ interferon; diminui a atividade das células de Langerhans, inibe a fosfolipase A_2 e somente *in vitro* em doses muito elevadas, causa decréscimo da taxa de mitose em queratinócitos. As células alvo para a CsA são portanto os linfócitos T, os monócitos e as células de Langerhans (Finzi, 1994). A CsA entra nas células, se liga a proteínas citoplasmáticas e nucleares, e interfere com a codificação de ácidos nucleicos envolvida na síntese de linfocinas (Elliot e cols., 1984; Graneli-Piperno e cols., 1984). Ela também impede a secreção de γ interferon, um efeito ligado à inibição de células NK induzida por drogas, sem no entanto afetar a síntese de α e β interferon, que são produzidos por leucócitos e fibroblastos respectivamente (Kalman e Klimpel, 1983). Embora a droga impeça a diferenciação de células T citotóxicas precursoras em linfócitos T maduros; ela não inibe a atividade dos linfócitos T citotóxicos que já foram gerados. A CsA interfere em estágios muito precoces do ciclo celular, afetando a proliferação linfóide somente no início do estágio mitogênico, e não afeta o linfócito desde que a atividade mitogênica já tenha sido desencadeada (Burckhardt e Guggenheim, 1979; Hess e cols., 1983).

Têm aumentado as evidências do envolvimento de linfócitos T supressores mediando a falta de resposta aos transplantes. A CsA estimula a produção de linfócitos T supressores (Dos Reis e Shevach, 1982; Hutohing e cols., 1983; Hess e cols., 1983; Kupieok-Weglinski e cols., 1984).

Recentemente, a CsA tem sido empregada no tratamento de portadores de psoríase com bons resultados, sua ação terapêutica provavelmente se deve à inibição de receptores para interleucina 8 nos queratinócitos (Sohuls e cols., 1993; Kemény e cols., 1994)

Administração e efeitos colaterais

A CsA é um peptídeo lipofílico oíclioo incompletamente e irregularmente absorvido no trato gastrointestinal. Isto origina uma variabilidade interindividual nas concentrações plasmáticas. O estabelecimento da dosagem é baseado no peso corporal. Além disso, a biodisponibilidade pode ser melhorada com o decorrer da terapia. A droga tem alta propensão a se ligar às proteínas do plasma, hemácias e lipoproteínas, sendo que a CsA livre é inversamente proporcional ao hematócrito. Um aumento de 10% no hematócrito pode reduzir a concentração plasmática em 10 a 14% (Guercki e cols., 1985).

A CsA é metabolizada no fígado pelo citocromo P 450 e oxidases de função mista em 12 metabólitos finais com propriedades imunossupressoras mínimas (Maurer e cols., 1984). A maioria dos metabólitos são excretados com a bile através das fezes, e apenas 10% é excretado através dos rins, além disso a meia vida da CsA varia de 7,9 a 10,2 horas (Kahan, 1989; Brinskov e cols., 1992). Compostos e drogas que induzem o metabolismo de enzimas hepáticas como a rifampicina, fenobarbital e fenitoína podem reduzir a concentração plasmática de CsA e provocar a rejeição (Keown e cols., 1984; Freeman e cols., 1984; Modry e cols., 1985). Por outro lado, o cetoconazol que inibe o

metabolismo hepático eleva as concentrações, e isto resulta em nefrotoxicidade, a menos que a dosagem seja ajustada. Experimentalmente, algumas enzimas indutoras reduzem a nefrotoxicidade sem afetar a imunossupressão (Ferguson e cols., 1982; Cunningham e cols., 1983). A disfunção hepática pode predispor à nefrotoxicidade devido à diminuição do metabolismo da CsA (Yee e cols., 1984).

A administração da CsA pode ser feita por via oral, intramuscular e endovenosa, e a dosagem deve ser individualmente ajustada, seguindo o padrão geral estabelecido por vários centros com experiência em transplantes (Stiller, 1983; Kahan e cols., 1983). A dose inicial é de aproximadamente 15 mg/Kg/dia com ajuste gradativo durante o primeiro mês para uma dose de manutenção de 5 a 20 mg/Kg/dia, que equivale a concentrações sorológicas entre 100 e 400 ng/ml. As doses endovenosas equivalem a 1/3 da dose oral. A monitoração dos níveis séricos de CsA no sangue por meio de radioimunoensaio ou cromatografia líquida de alta pressão pode ser útil para estabelecer a dose imunossupressora mais efetiva para cada indivíduo, com uma toxicidade relativamente baixa, embora existam diferentes pontos de vista sobre o assunto.

Infelizmente, efeitos colaterais importantes como a nefrotoxicidade e a hipertensão impedem seu uso mais generalizado. Manifestações crônicas de sua toxicidade são dependentes principalmente da dose e do tempo de tratamento. Há várias

complicações possíveis do tratamento com CsA, entre elas a fibromatose gengival.

FIBROMATOSE GENGIVAL INDUZIDA POR CsA

A associação entre a terapia com CsA e a fibromatose gengival foi relatada no início da década de 80 (Starzl e cols., 1980; Calne e cols., 1981). Experimentos subsequentes com animais confirmaram este efeito indesejável. Tanto cães como gatos com doses de 15 a 45 mg/Kg e 45 a 95 mg/Kg respectivamente, desenvolveram aumentos gengivais, sendo as alterações reversíveis com a interrupção do uso da droga (Ryffel e cols., 1983).

Os primeiros casos de fibromatose gengival induzida por CsA foram relatados especificamente na literatura odontológica em 1983 (Rateitschak-Pluss e cols., 1983). A fibromatose induzida por CsA se inicia com um aumento papilar mais pronunciado na região vestibular da gengiva do que na palatina. O aumento papilar progride e as papilas adjacentes coalescem, deixando o tecido gengival com uma aparência lobulada. O aumento gengival é restrito à largura da gengiva aderida e pode se estender em direção à coroa e interferir com a oclusão, mastigação e fala (Tyldesley e Rotter, 1984).

Através de biópsias de pacientes com fibromatose gengival induzida por CsA, têm-se observado aumento de fibras colágenas no tecido conjuntivo, áreas de substância basofílica, inflamação, hiperplasia epitelial, paraqueratose, acantose e edema (Wysocki e cols., 1982; Rateitschak-Pluss e cols., 1983; Tyldesley e Rotter, 1984).

O desenvolvimento da fibromatose gengival geralmente ocorre após três meses de tratamento com CsA. Entretanto, têm sido relatados casos em que a fibromatose surgiu um mês após o início da terapia (Tyldesley e Rotter, 1984; Seymour e cols., 1987).

A incidência de fibromatose gengival varia de 24 a 81% em adultos que sofreram transplante renal (Friskopp e Klintmalm, 1986; Philips e cols., 1988), e estas diferenças podem estar relacionadas com a dose da droga, concentração plasmática de CsA, duração da terapia, método de avaliação gengival e estado periodontal subjacente. Não se conhece a concentração mínima de CsA necessária para estimular a fibromatose gengival. Muitos estudos mostram que esta alteração está relacionada com altas doses, e tem sido mostrado correlações significantes entre concentrações plasmática e salivar da droga com a severidade da fibromatose gengival (Rostock e cols., 1986; McGaw e cols., 1987; Seymour e cols., 1987).

A fibromatose gengival induzida por CsA está associada com o acúmulo de placa, mas a patogênese é incerta (Daley e cols., 1986; Masuda e cols., 1989). O efeito local da CsA deve-se particularmente ao fato de que a placa dental pode ser considerada reservatório local de droga (McGaw e cols., 1987). Por outro lado, foi demonstrado recentemente que um rigoroso controle de placa e remoção de irritantes gengivais não inibem o desenvolvimento da fibromatose gengival induzida por CsA (Seymour e Smith, 1991).

Resultados de estudos clínicos sugerem que a incidência e severidade da fibromatose gengival em pacientes tratados com CsA

dependem da interação entre vários fatores. Estes incluem controle de placa, grau de inflamação gengival e extensão da destruição periodontal, dosagem e duração da terapia com CsA, concentrações teciduais e plasmáticas da droga e seus metabólitos, idade do paciente e talvez um comprometimento sistêmico subjacente (Seymour e Jacobs, 1992). Tem sido sugerida uma possível interação entre a CsA, hormônios sexuais e fibroblastos gengivais; ou então que fibroblastos de pacientes jovens podem ser mais susceptíveis à droga (Daley e cols., 1986; Sooriyamoorthy e cols., 1990)

Na fibromatose gengival o aumento de volume é devido basicamente ao acúmulo de tecido conjuntivo fibroso (Deliliers e cols., 1986; Yamasaki e cols., 1987). A atividade anormal dos fibroblastos pode resultar da ação direta da CsA sobre as células. Estudos explorando a ação da CsA sobre a proliferação de fibroblastos, síntese de proteínas e atividade colagenolítica tem produzido resultados conflitantes (Zebrowski e cols., 1986; Tipton e Dabbous, 1986).

Shincaglia e cols. (1992) estudou os efeitos da CsA em culturas de 5 linhagens de fibroblastos gengivais. Após 24 horas de incubação, observou-se aumento de 3 vezes na quantidade de cadeias de procólágeno, aumento no nível de procólágeno I e aumento no RNA mensageiro para colágeno tipo I; indicando estimulação direta da CsA sobre a síntese de colágeno, mas não sobre a síntese de DNA de fibroblastos gengivais. Ou seja, além de atuar sobre células T, a CsA *in vivo*, pode atuar diretamente sobre fibroblastos gengivais aumentando a produção de colágeno.

De acordo com os achados de Shincaglia e cols. (1992), houve diferenças morfológicas consideráveis entre as células tratadas com CsA nas concentrações de 100, 500 e 1.000 ng/ml, sendo que estas concentrações não alteraram a viabilidade celular, que foi medida por coloração com azul de Trypan.

COLAGENASE

Sabe-se que os fibroblastos liberam colagenase e degradam colágeno extracelular, porém outras células também podem desempenhar este papel, particularmente em estados patológicos. Certamente há uma variedade de células como os macrófagos e neutrófilos capazes de fagocitar, assim como de liberar proteases inclusive colagenase ou agentes capazes de estimular a degradação mediada por fibroblastos (Geofrey, 1987).

Perda de colágeno tem sido demonstrada na involução do tecido uterino após parto e no músculo esquelético durante a regressão após um período inicial de hipertrofia (Koob e Jeffrey, 1974; Sparrow, 1982).

Aumento na deposição de colágeno tem sido relatado na fibrose pulmonar, cirrose hepática, e aterosclerose. A perda de componentes do tecido conjuntivo tem sido relatada na artrite reumatóide e enfisema. Em alterações que apresentam degeneração do colágeno, os níveis de colagenase parecem estar aumentados (Okasaki e Maruyama, 1974; Kuhn e cols., 1976; Diegelmann e cols., 1980; Eyre

e cols., 1980; Takahashi e cols., 1980; Lindbland e Fuller, 1983; Stockley, 1983; Harris e cols., 1984).

Em alterações com deposição excessiva ou degradação de colágeno assim como em crescimentos e atrofias, há evidências tanto de degradação como de síntese de colágeno, independentemente se os níveis de colágeno aumentam ou diminuem (Geofrey, 1987).

O crescimento adaptativo de um tecido após cirurgia ou atrofia é maior se os fibroblastos estão normalmente presentes, não como células inertes, mas como células que continuamente sintetizam e degradam colágeno.

A importância da degradação na regulação da massa de colágeno tem sido estudada, e há evidências de que desempenha um importante papel na homeostase do colágeno (Hassell, 1982; Geofrey, 1987).

O colágeno, a principal proteína estrutural do tecido conjuntivo, é sintetizado pelos fibroblastos, e sua produção e degradação em estados fisiológicos e patológicos requerem uma regulação precisa. Além disso, fibroblastos gengivais humanos, como os de outros tecidos sintetizam várias metaloproteinases de matriz extracelular, inclusive collagenase e um inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP). Em condições fibrosas como quelóides e fibromatose gengival, o delicado mecanismo de equilíbrio entre a síntese e a degradação pode estar alterado, podendo resultar no acúmulo excessivo de colágeno na matriz extracelular. A densa deposição de colágeno pode ocorrer por aumento da síntese de

colágeno, por produção reduzida de colagenase ou por aumento da produção de inibidor tecidual de metaloproteinase (Fullmer e cols., 1969; Birkedal-Hansen, 1976; Golub e cols., 1976; Heath e cols., 1982; Tipton e cols., 1991).

Bauer (1977) realizando experimentos com cultura contendo um inibidor de síntese proteica, a cicloexamidina, verificou que pode ser detectada pouca colagenase no meio extracelular porque os fibroblastos praticamente armazenam pequenas quantidades de colagenase intracelular para posterior liberação.

De acordo com as observações de Bauer (1977), a atividade específica da colagenase no meio aumentou 8-10 vezes após a confluência das células em cultura, sendo que o volume da enzima aumentou somente 2 a 3 vezes. A atividade específica da colagenase aumenta 6 a 10 vezes rapidamente após a cultura atingir a confluência, entretanto em culturas pós-confluentes o volume de pró-enzima produzida decresce com o aumento da densidade celular.

A colagenase tem sido envolvida na fisiopatologia de doenças genéticas e adquiridas, portanto, o estudo da expressão da colagenase *in vitro* é importante para a interpretação de estudos em que esta enzima esteja associada à etiopatogenia (Eisen, 1970; Harris e Krane, 1974).

Geralmente, embora haja variação, parece ocorrer correlação inversa entre a atividade colagenolítica e a síntese de inibidor tecidual de metaloproteinase (Tipton e cols., 1991), ou seja, a atividade da colagenase e portanto, a degradação do colágeno depende do equilíbrio

local entre a concentração da enzima e seus inibidores (Dean e cols., 1989).

Tem sido sugerido que a collagenase desempenha um importante papel na metamorfose de anfíbios, na cura de feridas cirúrgicas e na patogênese de certas doenças, entretanto, o mecanismo que regula a sua síntese, liberação e atividade é desconhecido em grande parte (Eisen e Gross, 1965; Grillo e Gross, 1967; Lazarus e cols., 1968; Evason e cols., 1968; Eisen, 1969)

A collagenase da gengiva de babuínos apresenta forte reação cruzada com anticorpos anti-collagenase humana, mas a curva padrão de inibição, obtida a partir de diluições seriadas desta enzima não foi semelhante ou paralela à curva obtida para collagenases humanas, indicando que a reatividade cruzada não representa propriamente uma identidade imunológica completa. Por outro lado, a curva padrão de inibição obtida por várias diluições de quatro tipos de collagenases humanas: pele, membrana sinovial, gengiva e polimorfonucleares, mostraram-se paralelas, o que fundamenta o conceito de que estas enzimas são intimamente relacionadas, sendo que collagenases de espécies filogeneticamente distantes, apresentam reação cruzada menos intensa, indicando que as enzimas destas espécies tem pouca semelhança estrutural com as collagenases humanas (Bauer e cols., 1972).

Produção e mecanismos de ação

A collagenase da gengiva é encontrada principalmente na forma latente, e isto pode ser explicado por 3 hipóteses; na primeira a enzima é sintetizada como zimogênio ou pró-enzima contendo regiões que quando clivadas expõem o sítio ativo da enzima (Harper e cols., 1971; Vaes, 1972a); na segunda, a collagenase sintetizada é secretada na forma ativa, no entanto inibidores se ligam à molécula transformando-a numa forma inativa (Sellers e cols., 1977). De acordo com Stricklin e cols. (1978) e Uitto e cols. (1980), há uma terceira possibilidade, em que a collagenase seria ativada através de uma modificação conformacional da molécula, o que suporta a teoria da autoativação, ainda pouco conhecida (Piez e Reddi, 1981).

De acordo com os resultados de Birkedal-Hansen e cols. (1978), os fibroblastos de gengiva bovina em cultura mantiveram a capacidade de produzir collagenase em meio sem soro por 5 a 8 dias, sendo que durante este período a produção diária de collagenase decresceu progressivamente. Além disso, a enzima ativada por incubação com tripsina hidrolizou colágeno de maneira semelhante às collagenases de mamíferos.

O trabalho de Birkedal-Hansen e cols. (1978) indica que os fibroblastos em cultura sintetizam colágeno e collagenase ao mesmo tempo, e também indica que o mecanismo de regulação que protege o colágeno recém-sintetizado da hidrólise imediata, fundamenta-se no fato de que a enzima é liberada como um zimogênio.

Estudos mostram que a collagenase latente coletada *in vitro* ou *in vivo* é um zimogênio ou um complexo extracelular formado pela ligação da enzima com um inibidor (Eisen e cols., 1971; Vaes, 1972b; Kruze e Wojtecka, 1972; Harper e Gross, 1972; Oronski e cols., 1973; Abe e Nagai, 1973).

A collagenase é uma enzima de importância crucial para a função dos órgãos e sistemas dos mamíferos, atuando numa única região da molécula de colágeno, sendo específica e indispensável para a iniciação da degradação do colágeno (Bauer e cols., 1975).

Tem sido demonstrado que os fibroblastos, além de procólágeno, liberam também collagenase, que cliva especificamente a molécula de colágeno, o que sugere que os fibroblastos também desempenham um papel ativo no catabolismo de colágeno. Fibroblastos de diferentes origens sintetizam e liberam collagenase em cultura (Werb e Burleigh, 1974; Bauer e cols., 1975;).

A collagenase dos fibroblastos, como outras collagenases de mamíferos exige Ca^{++} , sendo que a atividade máxima ocorre em pH neutro ou ligeiramente alcalino. A hidrólise do colágeno nativo resulta em clivagem das três cadeias a num local a 3/4 de distância do radical NH_2 -terminal da molécula. Esta clivagem leva à rápida degradação a temperaturas fisiológicas e os produtos da degradação sofrem ação posterior de outras enzimas proteolíticas (Harris e Krane, 1974; Bauer e cols., 1975).

Análises do colágeno após clivagem inicial por collagenase gengival têm revelado fragmentos de 3/4 e 1/4 derivados da molécula de

colágeno, o que é característico da ação das collagenases de vertebrados (Fullmer e cols., 1969; Uitto e Raeste, 1978; Uitto e cols., 1978).

Ativação

De acordo com Hassell e cols. (1976) e Strickilin e cols. (1977) a collagenase é sintetizada e secretada como uma pró-enzima, que necessita da ação de outra enzima para ser ativada, sem o que não há atividade collagenolítica.

O soro é um potente inibidor de collagenase humana e, para que a atividade da collagenase seja detectada o soro fetal precisa ser removido do meio de cultura (Eisen e cols, 1970 e 1971). Além disso, de acordo com Bauer (1975), a enzima é secretada em meio de cultura sem soro, na forma inativa, podendo ser ativada por pré-incubação com tripsina, porém os fatores que regulam a ativação da collagenase não estão bem definidos.

A collagenase obtida de fibroblastos gengivais existe principalmente na forma latente, podendo ser experimentalmente ativada com tratamento por tripsina ou compostos que reagem com grupos sulfidríla das proteínas (Birkedal-Hansen e cols., 1976; Uitto e Raeste, 1978; Uitto e cols., 1981). Birkedal-Hansen e cols. (1976) verificaram em culturas de fibroblastos de gengiva bovina que o peso molecular da collagenase latente e ativa foi de 78 e 60 kD respectivamente.

A collagenase de gengiva humana pode ser ativada pelo acetato p-aminofenilmercúrico (APMA) proporcionando aumento significativo da degradação de colágeno (Uitto e cols., 1984).

Através de síntese de metaloproteinases os macrófagos são capazes de ativar collagenase produzida por eles próprios. A cathepsina G, uma proteinase neutra de neutrófilos, é capaz de ativar a collagenase produzida por estas mesmas células (Horowitz e cols., 1976; Macartney e Tschesche, 1980). Além disso, a calicreína e a plasmina são capazes de produzir ativação de collagenase (Werb e cols., 1977; Nagase e cols., 1982;).

Inibição

Parece claro que os inibidores têm um papel ativo na regulação da atividade da collagenase, e provavelmente, são sintetizados por todos os tecidos que sintetizam collagenase. Além disso, há inibidores no plasma, especialmente a α_2 -macroglobulina e β_1 -anticollagenase que se ligam irreversivelmente à collagenase ativa, transformando-a em forma inativa (Eisen e cols., 1971; Werb e cols., 1974; Wooley e cols., 1976).

Certas proteínas presentes no soro humano são responsáveis pela inibição parcial da atividade da collagenase humana, sendo que estes inibidores atuam tanto sobre a collagenase da pele humana como sobre as collagenases de girino, porque estas duas enzimas degradam a molécula de colágeno de maneira semelhante (Eisen e cols., 1968).

Eisen e cols. (1970a) demonstraram que tanto a α_1 -antitripsina como a α_2 M globulina presentes no soro humano, inibem

parcialmente a atividade da collagenase humana e de girino, e que a associação das duas anti-proteases tem um efeito aditivo.

Segundo Eisen e cols. (1970b) nem todas as collagenases respondem da mesma maneira. Por exemplo, a collagenase de polimorfonucleares humanos e do *Clostridium histolyticum* não são afetadas pelas concentrações de soro humano que inibem a collagenase da pele e de girinos.

Tem sido sugerido que a dificuldade em detectar atividade enzimática em cultura de células pode ser em parte, devida à presença de antiproteinasas conhecidas como inibidoras de collagenase (Eisen e cols., 1971). Além disso, há evidências de que a collagenase de girinos e de osso de camundongos sejam produzidas como pró-enzimas ou seja, como zimogênio. Embora para a collagenase humana isto não tenha sido efetivamente demonstrado, esta possibilidade não pode ser excluída (Harper e cols., 1971; Vaes, 1972; Bauer e cols., 1972).

Adachi e Nohara (1989) mostraram que para a collagenase da gengiva bovina há três inibidores, a concavalina A ligada e outros dois não ligados. A concavalina A é um dos dois inibidores específicos para collagenase de mamíferos, sendo que o terceiro inibidor é inespecífico e também inibe a tripsina e a termolisina. Mizuno e cols. (1993) denominaram os inibidores não ligados (específico e não específico) de concavalina A não ligada e, verificou que pelo peso molecular e pela sequência de 12 aminoácidos serem idênticos, estes inibidores podem ser do tipo TIMP-2, semelhante ao encontrado na cartilagem bovina, no

endotélio da aorta bovina e no melanoma humano (Stetler-Stevenson e cols., 1989).

O inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMP) é uma proteína de 28 kD cujo mecanismo de regulação é o mesmo da procollagenase após tratamento com interleucina-1, ou seja, a interleucina-1 é capaz de induzir a síntese de ambos (Clark e cols., 1985; Murphy e cols., 1985; Postlethwaite e cols., 1988).

O inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMP) tem sido identificado nos meios de cultura de algumas células do tecido conjuntivo, no soro, no fluido amniótico, no líquido sinovial e na saliva (Docherty e Murphy, 1990; Overall e cols., 1991). O TIMP foi recentemente classificado em TIMP-1 e TIMP-2 (Docherty e cols., 1985; Carmichael e cols., 1986; Goldberg e cols., 1989; Stetler-Stevenson e cols., 1989; Boone e cols., 1990). Admite-se portanto, que o TIMP-1 e 2 participem fisiologicamente da regeneração e da renovação do tecido conjuntivo por inibição da atividade colagenolítica de várias proteases (Nomura e cols., 1993).

A detecção do TIMP *in vivo*, apresenta várias dificuldades técnicas, porque a proteína pode ser inativada por elastase de neutrófilos e agentes oxidantes (Okada e cols., 1988). Estas dificuldades só puderam ser contornadas com o surgimento de técnicas avançadas em biologia molecular como a reação de polimerização em cadeia por transcrição reversa (RT-PCR), que permite a detecção de RNA mensageiro para TIMPs que são sintetizados em quantidades muito reduzidas (Nomura e cols., 1993).

FIBRONECTINA

Estudos imunohistoquímicos demonstrando componentes da matriz extracelular gengival têm sido feitos, entretanto, o interesse principal está concentrado nos componentes colagenosos, sendo que pouco se conhece sobre proteínas não colagenosas, especialmente a fibronectina (Narayanan e Page, 1983; Chavrier e cols., 1984; Becker e cols., 1986; Cho e cols., 1987; Romanos e cols., 1993). Nos fibroblastos gengivais a fibronectina corresponde à principal glicoproteína sintetizada, juntamente com colágeno tipo I e III (Baum e Wright, 1980; Veron e cols., 1990). Não há dúvidas de que a fibronectina interage fortemente com outros constituintes da matriz e participa da organização estrutural dos tecidos. Suas funções são de grande importância, visto que estimula a locomoção celular, além de mediar também a adesão das células à matriz extracelular (Grinnell, 1984; Robert e Labat-Robert, 1991).

Hiperplásias teciduais produzidas por difenilhidantoína apresentam colágeno em índices normais. Por outro lado, a deposição de proteínas não colagenosas está 3 vezes aumentada em relação aos tecidos gengivais normais (Ballard e Butler, 1974).

As fibronectinas são glicoproteínas sintetizadas por uma ampla variedade de células *in vitro*, sendo os fibroblastos e células endoteliais as maiores produtoras. Entretanto, outras células como as epiteliais também sintetizam, porém em menores níveis. As fibronectinas têm sido relacionadas com uma ampla variedade de propriedades celulares, particularmente aquelas que envolvem as

interações das células com a matriz extracelular. Estas propriedades incluem adesão celular, morfologia e organização do citoesqueleto, migração, diferenciação, transformação oncogênica, fagocitose e hemostasia (Hynes e Yamada, 1982).

In vivo as fibroneotinas são encontradas nos fluidos corporais (300 µg/ml no plasma, e menores volumes em outros tecidos), matriz de tecido conjuntivo e maioria das membranas basais. Há dois tipos básicos de fibroneotina, a celular e a do plasma, no entanto, existem múltiplas formas de fibroneotina celular. Estudos com anticorpos monoclonais fornecem evidências de que as duas formas são distintas, visto que os anticorpos se ligam, de preferência, à fibroneotina celular (Atherton e Hyne, 1981; Nooman e cols., 1981). Embora as fibroneotinas do plasma e das células possam ser distinguíveis, ambas são muito semelhantes quanto às propriedades e funções.

A molécula de fibroneotina é assimétrica e consiste de duas subunidades semelhantes com peso molecular em torno de 220 kD, unidas por pontes dissulfeto e com terminal carboxila. Medidas biofísicas indicam que a molécula é flexível contendo domínios globulares compactos (Alexander e cols., 1978; Alexander, 1979).

Uma importante característica das fibroneotinas é a capacidade de interação específica com uma variedade de outras macromoléculas como gelatina, colágeno desnaturado, colágenos tipo I e V, fibrina e fibrinogênio.

Em microscopia eletrônica de transmissão, a fibroneotina é usualmente visualizada como uma molécula alongada com regiões de

flexibilidade aparentemente aumentada, podendo contudo, parecer globular sob certas condições (Engel e cols., 1981; Erickson e cols., 1981; Koteliansky e cols., 1981).

Experimentos *in vitro* têm demonstrado que a fibronectina poderia promover a migração celular em cultura e estimular a quimiotaxia (Ali e Hynes, 1978; Yamada e cols., 1978; Greenberg e cols., 1981). A habilidade da fibronectina promover migração de fibroblastos tem sido atribuída a uma única região de ligação celular da macromolécula (Postlethwait e cols., 1981; Seppä e cols., 1981).

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi analisar *in vitro*, a síntese de collagenase, de fibronectina, de proteína total, a atividade collagenolítica e a morfologia de fibroblastos de fibromatose gengival hereditária e de gengivas normais incubados com CsA em diferentes concentrações.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

INCUBAÇÃO DE FIBROBLASTOS COM (CsA) E OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE

Foram utilizadas 3 linhagens de fibroblastos gengivais normais (A, B e C) e 3 de fibromatose gengival hereditária (D, E e F) provenientes de culturas primárias. Para isto, foram usados fragmentos de tecido obtidos de gengivectomias realizadas em pacientes acompanhados pelo Prof. Lourenço Bozzo na Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP. As culturas primárias foram estabelecidas no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer pela Dra. Luiza L. Villa e Kátia B.L. Vieira. A suspensão celular foi descongelada e semeada para cultivo em frascos plásticos de 7,5 cm² com meio de cultura DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium) contendo soro fetal bovino (10%) e gentamicina (40 µg/ml). Células em fase logarítmica de crescimento, ainda em subconfluência, foram tripsinizadas e semeadas em duplicata na densidade de 25.000 células por poço (125.000 céls./ml) em placa de 96 poços. Após 4 h., o meio foi removido e os poços lavados 3 vezes com PBS-EDTA 1mM pH 7.3 e, meio de cultura sem soro fetal foi adicionado. Após 15 h. o meio foi removido, sendo adicionado 200 µl de meio novo contendo CsA nas concentrações de 250, 500 e 1.000 ng/ml. Como controle foram utilizadas células das 6 linhagens estudadas, sem adição de CsA. Decorridas 24, 48 e 72 h., o meio foi coletado e submetido aos ensaios.

CONTAGEM, TESTE DE VIABILIDADE E AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR APÓS INCUBAÇÃO COM CsA

Decorrido o período experimental de 48 h., as amostras de sobrenadante foram coletadas e feita a contagem celular após incubação com CsA (250, 500 e 1.000 ng/ml). Os poços da placa foram preenchidos com 25 µl de tripsina 0,25% em PBS-EDTA 1mM esterilizado e após a verificação do destacamento celular da parede do poço com ajuda de microscópio invertido de contraste de fase, a suspensão celular foi aspirada e colocada em tubo de centrifuga de 1,5 ml. O procedimento acima descrito foi repetido por mais 3 min.. Ao final obteve-se 50 µl de suspensão celular, sendo que 10 µl desta amostra foram colocados em câmara de Neubauer para contagem da densidade celular, obtendo-se assim o número de células por ml de suspensão. Para a comparação entre as médias, foi utilizado o teste t. Para o teste de viabilidade celular, decorridos os períodos de 24, 48 e 72 h., o sobrenadante foi coletado e adicionou-se a cada poço, 20 µl de PBS e 20 µl de azul de Trypan 0,4% por 2 min. Após isto, os poços foram lavados 3 vezes com PBS e as células observadas em microscópio invertido de contraste de fase. De acordo com a literatura, uma linhagem celular é considerada inviável quando mais que 10% de suas células se coram, visto que apenas células mortas se coram pelo azul de Trypan. O procedimento empregado para o teste de viabilidade celular permitiu também a observação da morfologia das 6 linhagens de fibroblastos incubados com CsA (250, 500 e 1.000 ng/ml).

ELETROFORESE DO SOBRENADANTE

As proteínas dos sobrenadantes coletados das culturas em duplicata incubadas com 250, 500 e 1.000 ng/ml de CsA foram precipitadas em 10 volumes de etanol absoluto a -20°C . Para cada amostra foram usados 350 μl de sobrenadante (175 μl de cada poço) e 3,5 ml de etanol absoluto. Após 16 h., as amostras foram centrifugadas por 10 min. a 15.000 rpm, o sobrenadante descartado e os tubos para centrífuga contendo o precipitado foram deixados secando à temperatura ambiente. Em seguida o precipitado foi ressuspenso em 50 μl de tampão de amostra redutor para a realização de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (sodium dodecyl sulphate, Sigma) gradiente (3 a 15%). Para a comparação do peso molecular foi utilizado como padrão o complexo laminina/nidogênio 400 kD (220 kD, 150 kD), albumina bovina (BSA) (66 kD) e albumina de ovo (43 kD) em tampão de amostra redutor. Terminada a eletroforese, o gel foi fixado por 1 h. em 100 ml de solução aquosa de metanol 50%, ácido acético 12% adicionada de 50 μl de formaldeído; lavado por 20 min. 3 vezes em etanol 50% sofrendo pré-tratamento com solução de tiosulfato de sódio 0,04% e lavado em água destilada. Após isto, o gel foi tratado com 100 ml de solução aquosa de nitrato de prata 0,2% adicionada de 75 μl de formaldeído durante 20 min. sob agitação, lavado rapidamente com água destilada, revelado em 100 ml de solução aquosa de carbonato de sódio 6% adicionada de 50 μl de formaldeído e 2 ml de tiosulfato de sódio 0,04%; lavado novamente 2 vezes por 2 min. e imerso em solução aquosa de metanol 50% e ácido acético

12% por 2 h. e depois colocado em água para posterior documentação fotográfica e desidratação em metanol (65%) e glicerol (0,5%).

COLAGENASE

Para os estudos enzimográficos, 20 µl do sobrenadante foram incubados em tampão de amostra não redutor e submetidos a eletroforese em gel (10%) de poliacrilamida contendo gelatina (2,11 mg/ml). Para a comparação do peso molecular, foi utilizada BSA (66 kD) e albumina de ovo (43 kD) como padrão. Após a eletroforese, o gel foi submetido a 2 lavagens de 30 min. em solução de Triton X-100 a 2% e, incubado em tampão Tris 10mM, CaCl₂ 5mM, pH 8.0 por 16 h. a 37 °C sob agitação. A seguir o gel foi removido do tampão e corado com azul de Coomassie 0,05% por 4 h., e desidratado em metanol (65%) e glicerol (0,5%).

ATIVIDADE COLAGENOLÍTICA

A ativação da colagenase foi feita a 37 °C durante 60 min. colocando-se 45 µl de sobrenadante referente a 48 h. de cultura e tripsina (5mg/ml) na concentração final de 100 µg/ml, 33,3 µg/ml, 11,1 µg/ml e 3,7 µg/ml. Decorrido este período, foi acrescentado a cada amostra 5 µl de PMSF (200 mM) (fenil-metil-sulfonil fluoreto) para bloquear a ação da tripsina. Foram adicionados 15 µl de colágeno tipo I (2mg/ml) (extraído de cauda de ratos) diluído em ácido acético 0,5%. Amostras do sobrenadante foram coletadas após 15, 30, 60, 120 e 180 min.. Como controle foi utilizada amostra de 15 µl de colágeno tipo I

(2 mg/ml) em ácido acético 0,5% adicionadas de 45 µl de tampão Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7,5 e com adição de tripsina e PMSF conforme descrito acima. Também como controle foi utilizada amostra de colágeno e meio de cultura contendo collagenase não ativada, ou seja, sem pré-incubação com tripsina. A análise foi feita através de eletroforese com gel gradiente (5 a 15%) de poliacrilamida. Às amostras foi adicionado tampão não redutor concentrado 2 vezes. O gel foi corado com azul de Coomassie 0,05% por aproximadamente 2 h. e descorado com solução de metanol 50% e ácido acético 10% por cerca de 5 h.. As amostras de sobrenadante foram comparadas visualmente com amostras de colágeno não degradado.

Extração e purificação de colágeno tipo I

Para a extração do colágeno I, foram utilizadas 4 caudas de ratos Wistar com peso corporal médio de 200 g. A cauda foi seccionada na raiz e a pele removida através de incisão longitudinal com auxílio de lâmina de bisturi nº 15. Os tendões foram retirados com pinça dente de rato e colocados em becker imerso em cubos de gelo. Os tendões foram colocados em cadinho, cortados em pequenos fragmentos e macerados. Foram então colocados em 100 ml de NaCl 0,45 M e centrifugados por 5 min. a 3.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 100 ml de NaCl 0,45 M a 4 °C, homogeneizado por 3 min. e recentrifugado por 5 min. a 3.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 100 ml de NaCl 2 M a 4 °C, homogeneizado por 3 min. e centrifugado por 5

min. a 3.000 rpm; este procedimento foi feito 2 vezes. A seguir o sobrenadante foi descartado e o precipitado submetido a extração em 300 ml de ácido acético 0,5 M a 4 °C, homogeneizado por 3 min. e armazenado a 4 °C por 15 h.. O sobrenadante (colágeno solúvel em ácido acético) foi coletado e novamente centrifugado a 15.000 rpm durante 15 min.. Terminada a centrifugação o sobrenadante foi extensivamente dializado (3 trocas de 3 litros cada uma) contra água deionizada a 4 °C, e em seguida o colágeno foi liofilizado para estocagem.

FIBRONECTINA

Para o estudo da secreção de fibronectina no meio extracelular, foi utilizada a técnica do “dot Blot”. Foi gotejado 15 µl do sobrenadante sobre uma fita de membrana de nitrocelulose, posteriormente submetida à reação com anticorpo anti-fibronectina.

Inicialmente as fitas de nitrocelulose foram incubadas com BSA 3% durante 1h. em câmara úmida, a seguir lavadas com PBS, incubadas por mais 1h. com anticorpo primário anti-fibronectina (5 mg/ml) diluído na proporção de 1/500 em BSA 0,3%, lavadas em PBS, incubados com anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído na proporção de 1/1.000 em BSA 0,3%. As fitas foram a seguir lavadas com PBS e reveladas em solução composta por 4 ml de PBS, 2,5 mg de DAB (diaminobenzidina) e 4 ml de H₂O₂ 30%. Como controle positivo utilizou-se a proteína fibronectina e como controle negativo utilizou-se soro de coelho ao invés do anticorpo primário.

INATIVAÇÃO DE METALOPROTEINASE

Inicialmente foi feito ensaio enzimográfico convencional com substrato de gelatina conforme descrito anteriormente. Terminada a eletroforese o gel foi lavado 2 vezes em solução de Triton X-100 2%, cortado em tiras, cada uma correspondendo a uma canaleta do gel, as quais foram incubadas durante 16 h. com 20 ml de fenantrolina, PMSF e EDTA diluídas em tampão convencional para zimograma (Tris 10 mM, CaCl_2 5 mM, pH 8.0).

RESULTADOS

RESULTADOS

CONTAGEM E TESTE DE VIABILIDADE CELULAR APÓS INCUBAÇÃO COM CsA

Não houve diferenças significantes no número de células após 48 h. de incubação com diferentes concentrações de CsA como mostrado nas figuras de 1 a 6. A figura 7 mostra as médias do número de cél./ml entre as duplicatas das 6 linhagens controle, em que se observa diferenças estatisticamente significantes para as linhagens E e F (fibromatose gengival).

Em todos os períodos e concentrações de CsA usadas (250, 500 e 1.000 ng/ml), as células se mostraram com menos de 10% das células coradas pelo azul de Trypan.

MORFOLOGIA CELULAR APÓS INCUBAÇÃO COM CsA

Decorridas 24, 48 e 72 h. de incubação das 6 linhagens de fibroblastos com 250 e 500 ng/ml de CsA, não observou-se modificações morfológicas. Os fibroblastos apresentaram em média três prolongamentos citoplasmáticos longos, dando à célula um aspecto estrelado, com os núcleos discretamente alongados. Este aspecto foi considerado compatível com a normalidade.

Após 72 h. de incubação com CsA na concentração de 1.000 ng/ml, ocorreram alterações morfológicas em todas as linhagens. As células apresentaram-se arredondadas, com aparente

retração dos prolongamentos citoplasmáticos e diminuição do volume do citoplasma, além da presença de vacúolos e granulações. Os núcleos estavam arredondados, mais volumosos e proeminentes. Não foi observada qualquer alteração nas células incubadas pelo mesmo período com as outras concentrações de CsA.

ELETROFORESE DO SOBRENADANTE

Os ensaios de precipitação de proteínas para as linhagens de fibroblastos de gengiva normal (A, B e C) mostraram aumento crescente da intensidade das bandas para a linhagem A correlacionado com o aumento da concentração de CsA. Para a linhagem B observou-se bandas com intensidade semelhante, com exceção na concentração de 1.000 ng/ml de CsA, em que a intensidade das bandas apareceu reduzida (fig. 8). Para a linhagem C observou-se bandas com mesma intensidade de coloração, independentemente da concentração de CsA.

Para as linhagens E e F verificou-se que as células incubadas com CsA na concentração de 250 ng/ml apresentaram bandas mais intensamente coradas em relação às células incubadas com 500 e 1.000 ng/ml de CsA (fig. 9). Para a linhagem D, as bandas apresentaram-se coradas com a mesma intensidade.

COLAGENASE

A análise enzimográfica mostrou padrão heterogêneo na secreção de collagenase entre as linhagens celulares. Após 24 h. em cultura, os fibroblastos controles das 6 linhagens secretaram metaloproteinase em quantidade reduzida. Nas linhagens B, C e D não detectou-se a produção de enzima (fig. 10, canaletas B, C e D).

A atividade enzimática foi maior no período de 72 h., quando todas as linhagens celulares secretaram metaloproteinase.

Além da banda principal, migrando com peso molecular aproximado de 57 kD, observou-se a presença de outras bandas mais fracas com menor peso molecular e que, poderiam representar formas clivadas da mesma metaloproteinase, ou mesmo outras enzimas (fig. 10).

Quando os fibroblastos foram incubados com CsA nas concentrações de 250, 500 e 1000 ng/ml, não se observou alterações na quantidade de enzima produzida pelas células da mesma linhagem, e todas as linhagens responderam de forma semelhante à incubação com diferentes concentrações de CsA (figs. 11, 12 e 13).

ATIVIDADE COLAGENOLÍTICA

A collagenase do sobrenadante após 72 h. de cultura com 500 ng/ml de CsA, quando ativada digeriu completamente o substrato de colágeno tipo I após 15 min. (fig. 14, coluna 7).

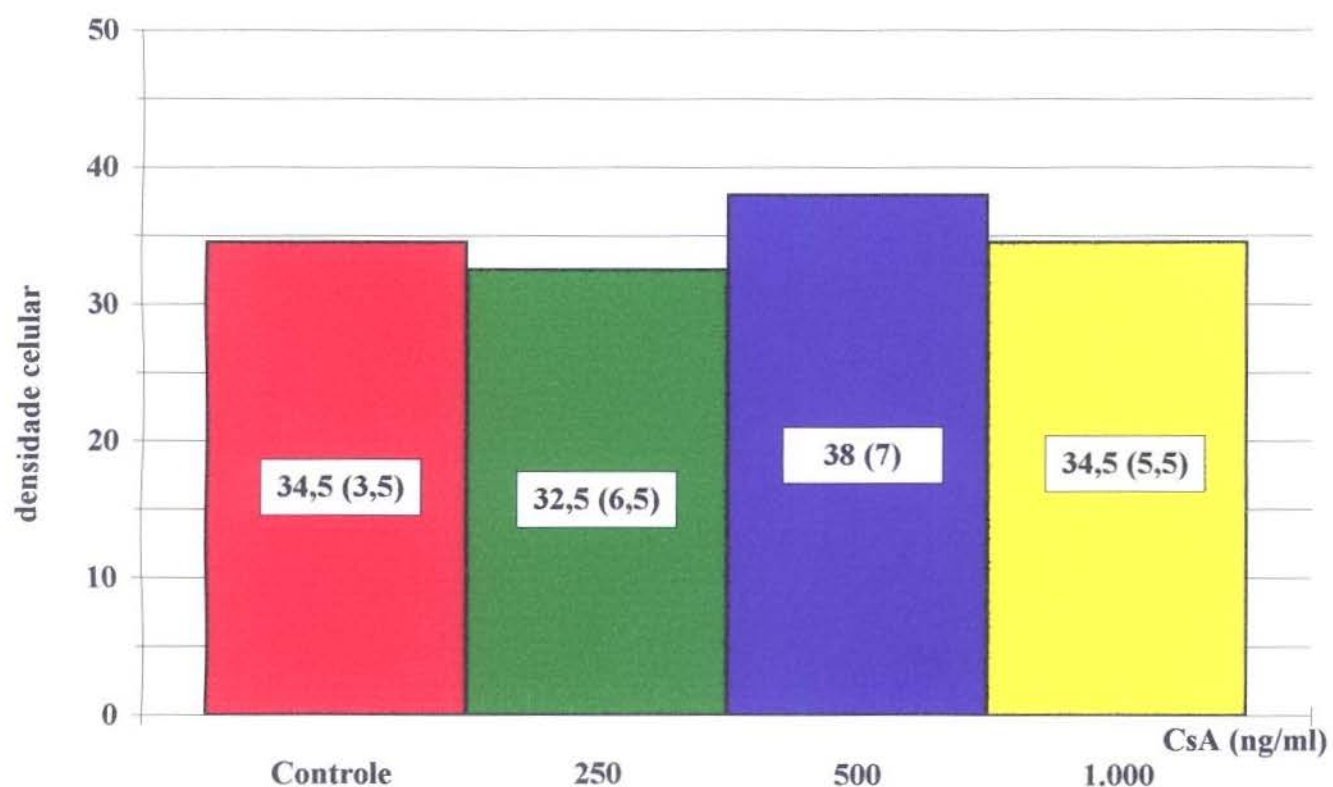
FIBRONECTINA

Todas as linhagens de fibroblastos estudadas secretaram fibronectina no meio extracelular, de forma que a CsA nas diferentes concentrações não influenciou a secreção (fig. 15).

INATIVAÇÃO DE METALOPROTEINASE

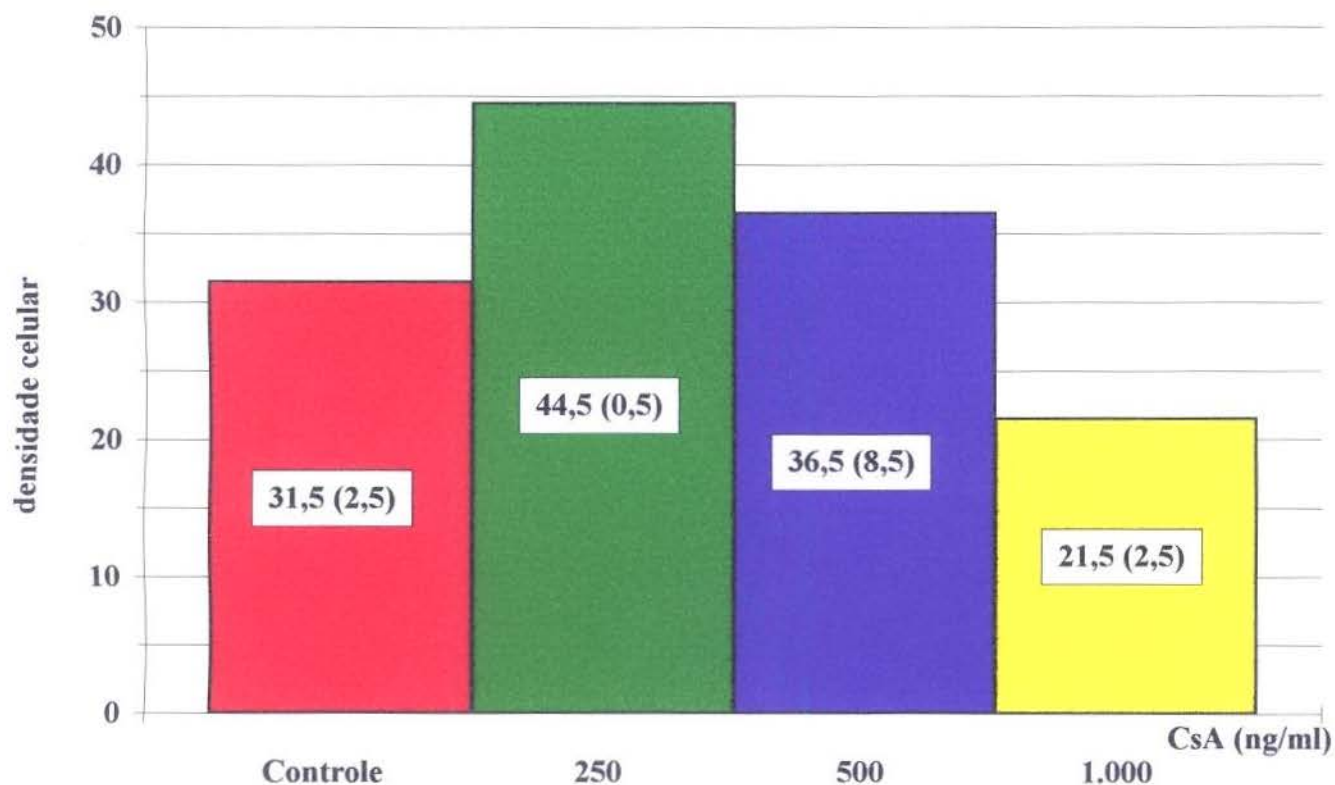
Neste ensaio com sobrenadante de 72 h. de cultura, após a realização do zimograma convencional anteriormente descrito, a fita controle que foi incubada com tampão para zimograma exibiu uma banda de maior peso molecular compatível com o peso da metaloproteinase obtida nos zimogramas anteriores, sugestiva de pró-colagenase. Além disso, observou-se claramente a presença de uma segunda banda de menor peso molecular compatível com colagenase na forma clivada. As fitas que foram incubadas com PMSF 0,5 mM exibiram padrão eletroforético idêntico à fita controle, enquanto que a fenantrolina 0,5 mM inibiu totalmente a atividade gelatinolítica. O EDTA na concentração de 0,5 mM não inibiu a atividade enzimática (fig. 16).

Figura 1. Densidade celular da linhagem A (gengiva normal) incubada durante 48 horas com CsA (250, 500, 1.000 ng/ml). Inicialmente foram incubadas $12,5 \times 10^4$ cel./ml. Os valores abaixo multiplicados por 10^4 correspondem às médias entre as duplicatas que representam o número absoluto de cel./ml de suspensão. Os valores expressos entre parênteses correspondem ao desvio padrão.



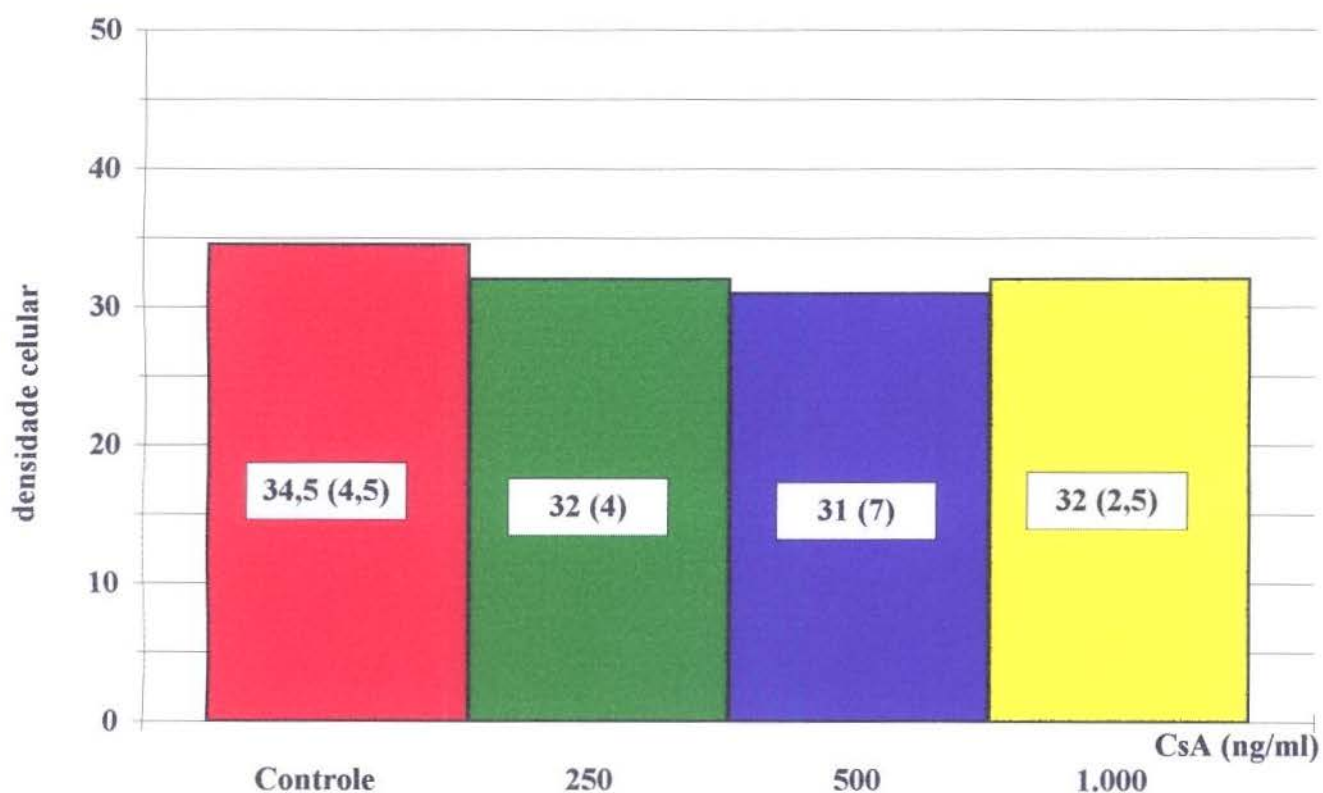
A diferença entre as médias não foi estatisticamente significante a nível de 5%.

Figura 2. Densidade celular da linhagem B (gengiva normal) incubada durante 48 horas com CsA (250, 500, 1.000 ng/ml). Inicialmente foram incubadas $12,5 \times 10^4$ cel./ml. Os valores abaixo multiplicados por 10^4 correspondem às médias entre as duplicatas que representam o número absoluto de cel./ml de suspensão. Os valores expressos entre parênteses correspondem ao desvio padrão.



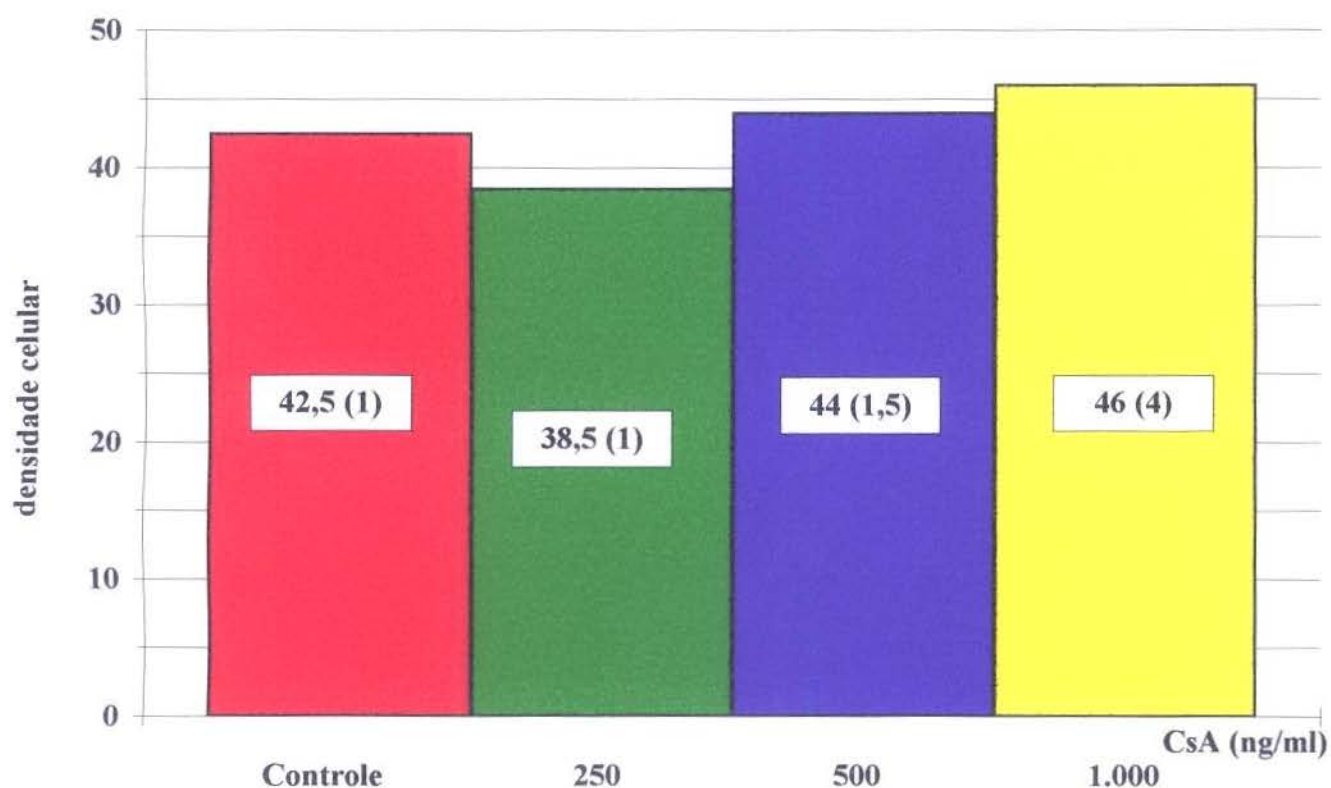
A diferença entre as médias não foi estatisticamente significante a nível de 5%.

Figura 3. Densidade celular da linhagem C (gengiva normal) incubada durante 48 horas com CsA (250, 500, 1.000 ng/ml). Inicialmente foram incubadas $12,5 \times 10^4$ cel./ml. Os valores abaixo multiplicados por 10^4 correspondem às médias entre as duplicatas que representam o número absoluto de cel./ml de suspensão. Os valores expressos entre parênteses correspondem ao desvio padrão.



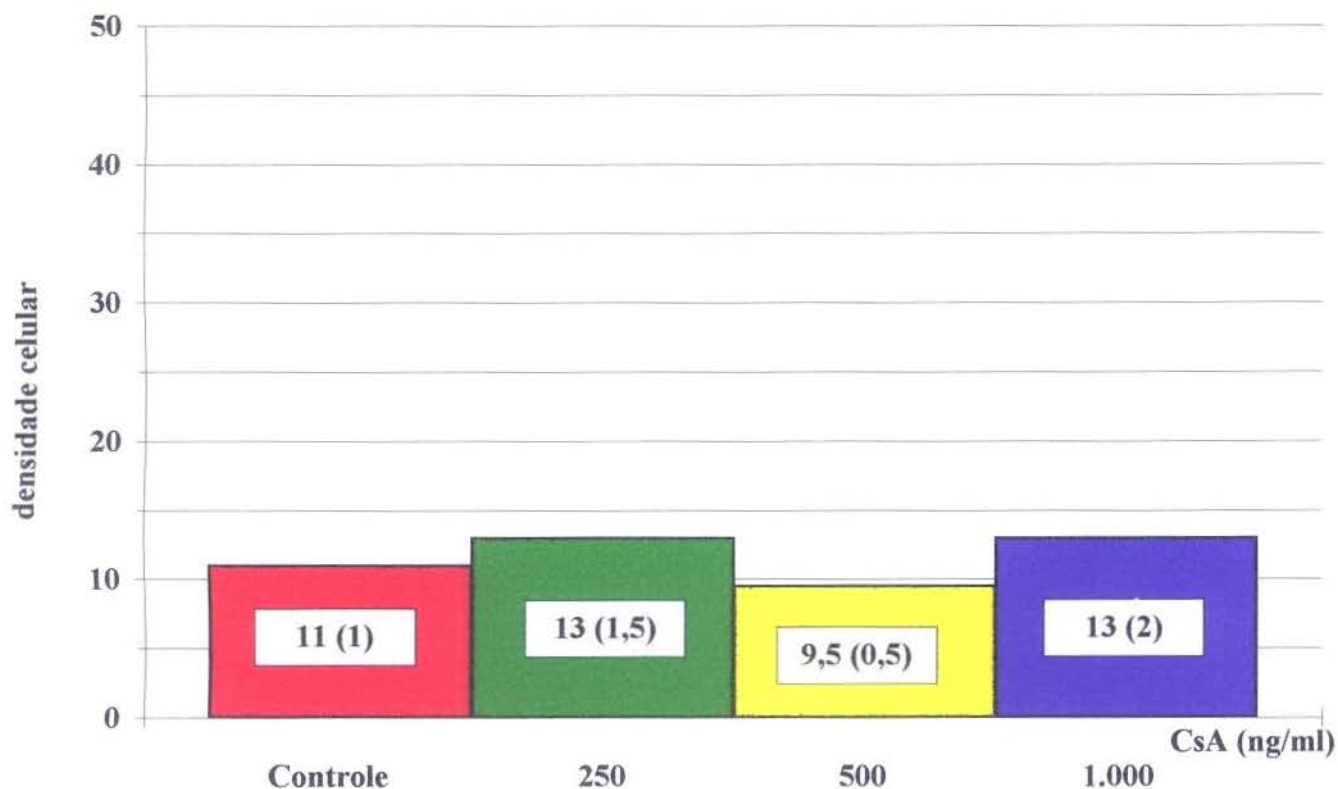
A diferença entre as médias não foi estatisticamente significante a nível de 5%.

Figura 4. Densidade celular da linhagem D (fibromatose gengival) incubada durante 48 horas com CsA (250, 500, 1.000 ng/ml). Inicialmente foram incubadas $12,5 \times 10^4$ cel./ml. Os valores abaixo multiplicados por 10^4 correspondem às médias entre as duplicatas que representam o número absoluto de cel./ml de suspensão. Os valores expressos entre parênteses correspondem ao desvio padrão.



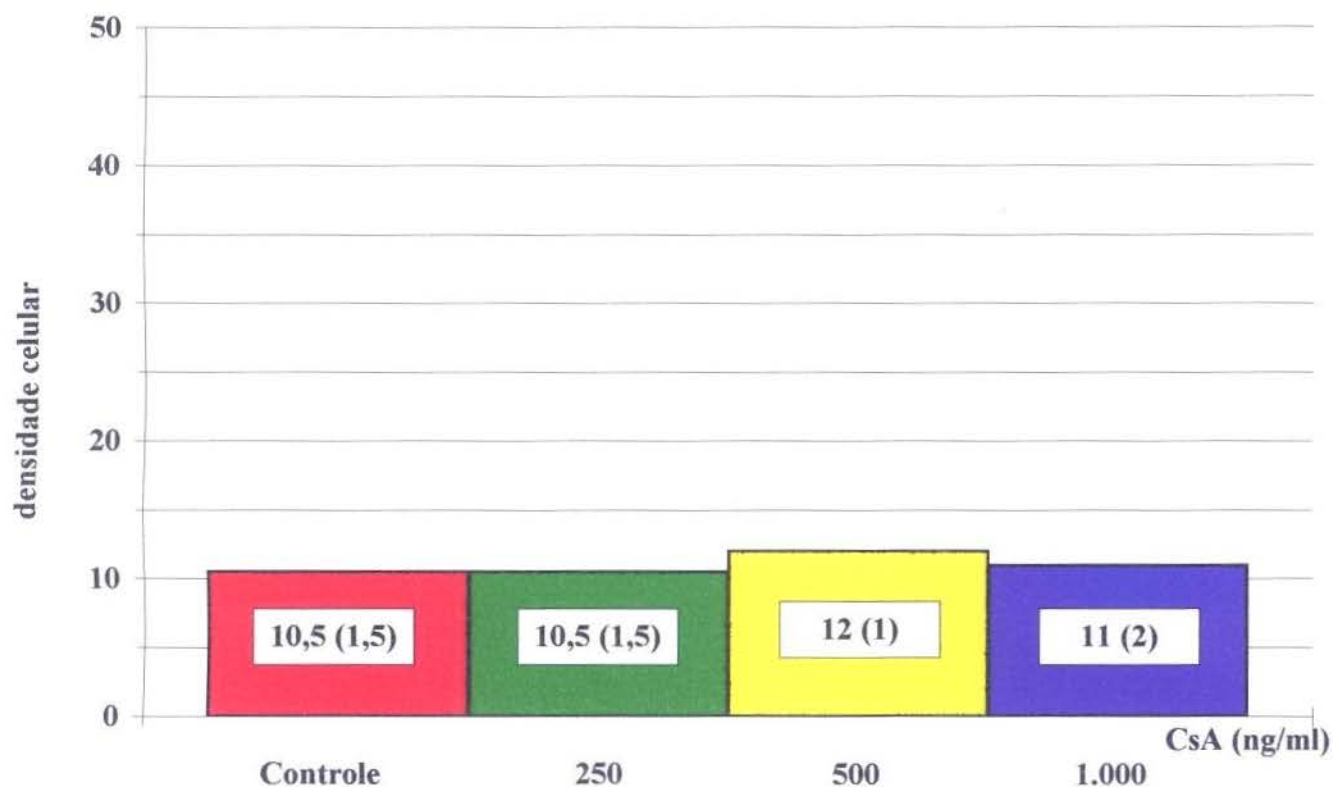
A diferença entre as médias não foi estatisticamente significante a nível de 5%.

Figura 5. Densidade celular da linhagem E (fibromatose gengival) incubada durante 48 horas com CsA (250, 500, 1.000 ng/ml). Inicialmente foram incubadas $12,5 \times 10^4$ cel./ml. Os valores abaixo multiplicados por 10^4 correspondem às médias entre as duplicatas que representam o número absoluto de cel./ml de suspensão. Os valores expressos entre parênteses correspondem ao desvio padrão.



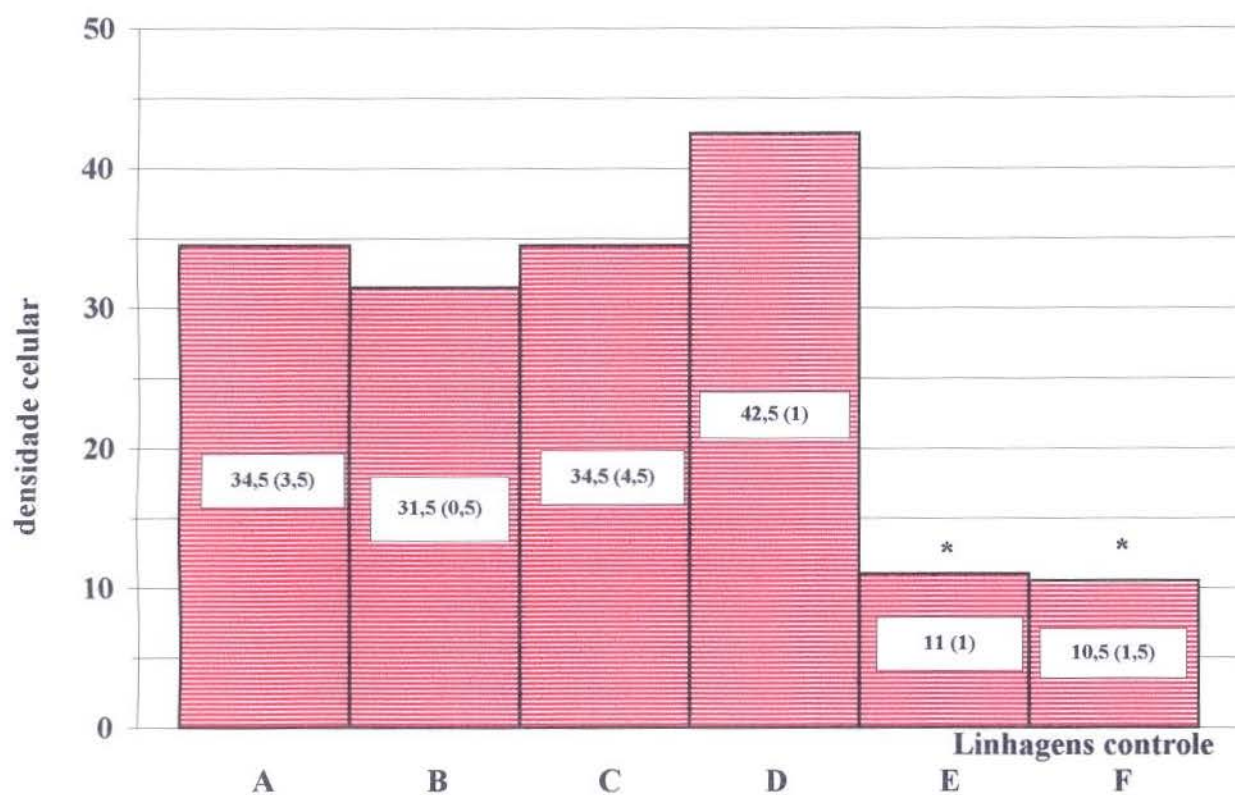
A diferença entre as médias não foi estatisticamente significativa a nível de 5%.

Figura 6. Densidade celular da linhagem F (fibromatose gengival) incubada durante 48 horas com CsA (250, 500, 1.000 ng/ml). Inicialmente foram incubadas $12,5 \times 10^4$ cel./ml. Os valores abaixo multiplicados por 10^4 correspondem às médias entre as duplicatas que representam o número absoluto de cel./ml de suspensão. Os valores expressos entre parênteses correspondem ao desvio padrão.



A diferença entre as médias não foi estatisticamente significante a nível de 5%.

Figura 7. Densidade celular da linhagens controle (A a F) após 48 horas sem CsA. Inicialmente foram incubadas $12,5 \times 10^4$ cel./ml. Os valores abaixo multiplicados por 10^4 correspondem às médias entre as duplicatas que representam o número absoluto de céls./ml de suspensão. Os valores expressos entre parênteses correspondem ao desvio padrão.



* A diferença entre as médias foi estatisticamente significante para as linhagens E e F a nível de 5%.

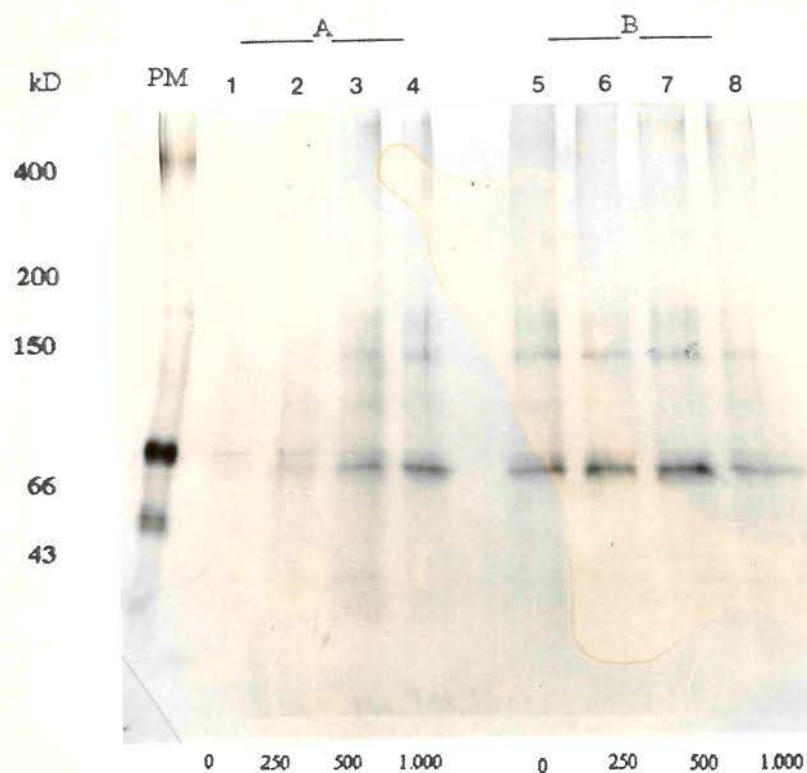


Figura 8. Eletroforese das linhagens A (1 a 4) e B (5 a 8) após 48 h. em cultura. Fibroblastos controle (sem CsA - 1 e 5), CsA 250 ng/ml (2 e 6), CsA 500 ng/ml (3 e 7), CsA 1.000 ng/ml (4 e 8). PM (padrão de peso molecular).

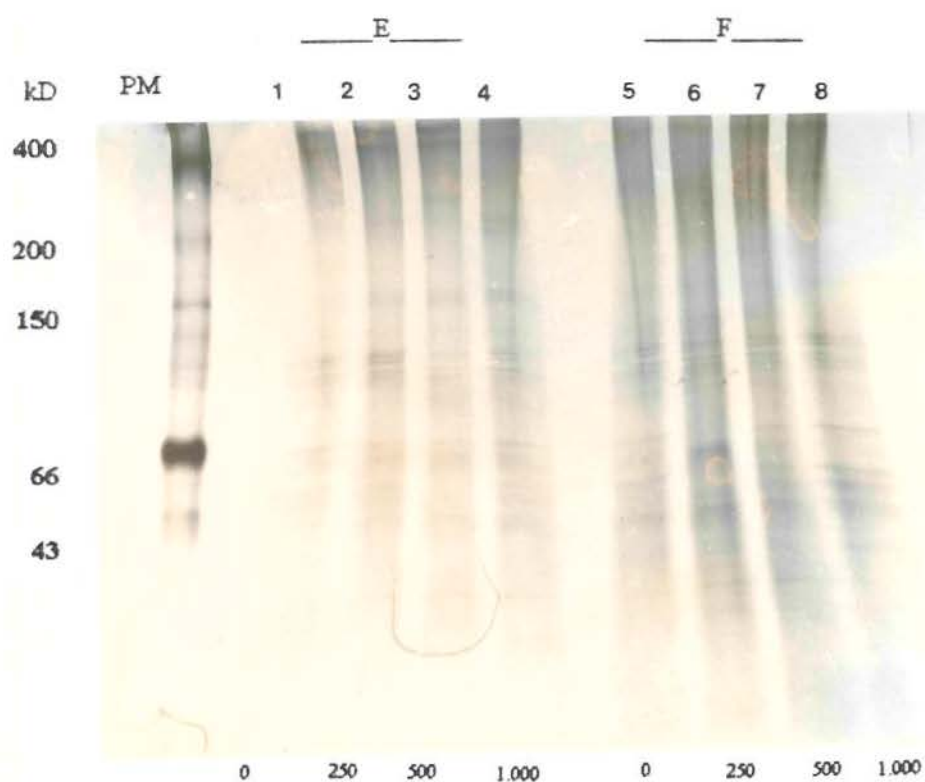


Figura 9. Eletroforese das linhagens E (1 a 4) e F (5 a 8) após 48 h. em cultura. Fibroblastos controle (sem CsA - 1 e 5), CsA 250 ng/ml (2 e 6), CsA 500 ng/ml (3 e 7), CsA 1.000 ng/ml (4 e 8). PM (padrão de peso molecular).

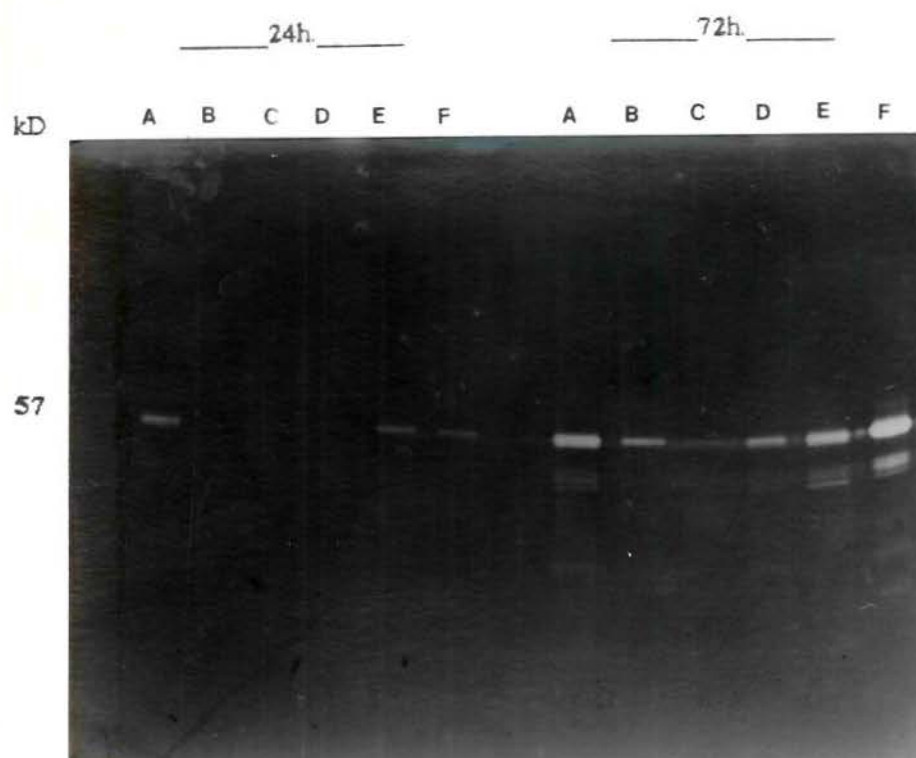


Figura 10. Zimograma das 6 linhagens de fibroblastos controles A a F (sem CsA) após 24 h. (1 a 6) e após 72 h. (7 a 12). Não detectou-se gelatinase nas linhagens B, C e D após 24 h.

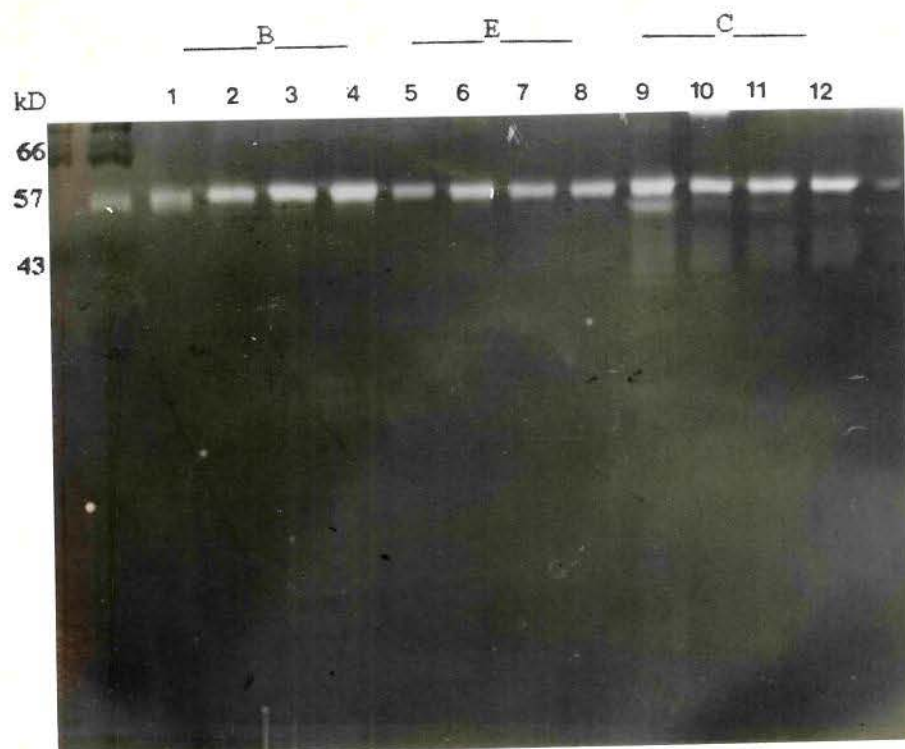


Figura 11. Zimograma das linhagens B (1 a 4), E (5 a 8) e C (9 a 12) mostrando secreção de gelatinase após 48 h. em cultura. Fibroblastos oontrolés (sem CsA - 1, 5 e 9), CsA 250 ng/ml (2, 6 e 10), CsA 500 ng/ml (3, 7 e 11) e CsA 1.000 ng/ml (4, 8 e 12).

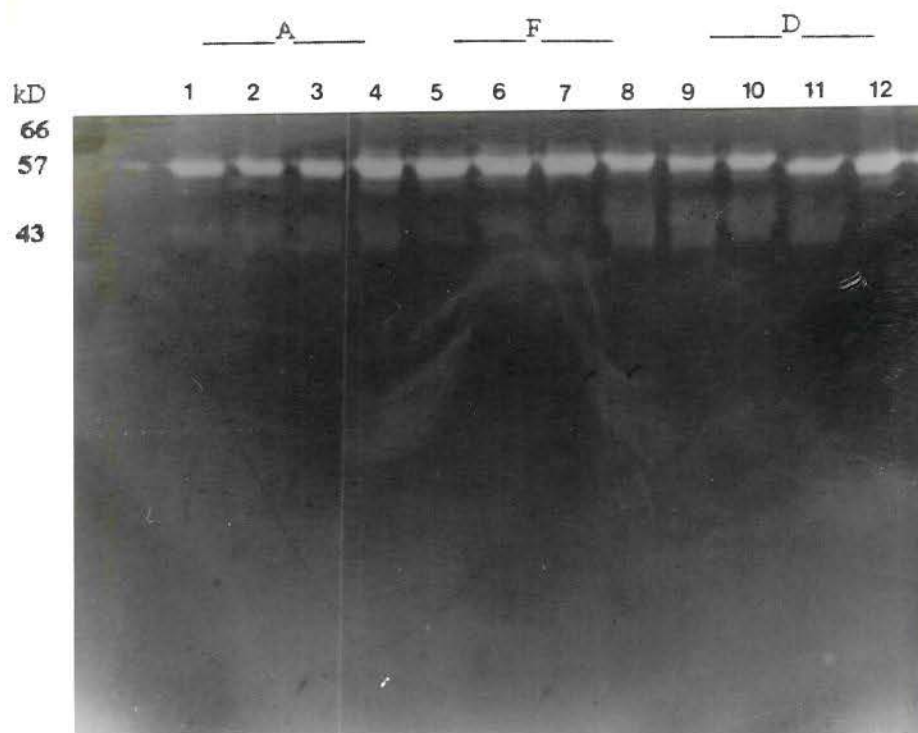


Figura 12. Zimograma das linhagens A (1 a 4), F (5 a 8) e D (9 a 12) mostrando secreção de gelatinase após 48 h. em cultura. Fibroblastos controles (sem CsA - 1, 5 e 9), CsA 250 ng/ml (2, 6 e 10), CsA 500 ng/ml (3, 7 e 11) e CsA 1.000 ng/ml (4, 8 e 12).

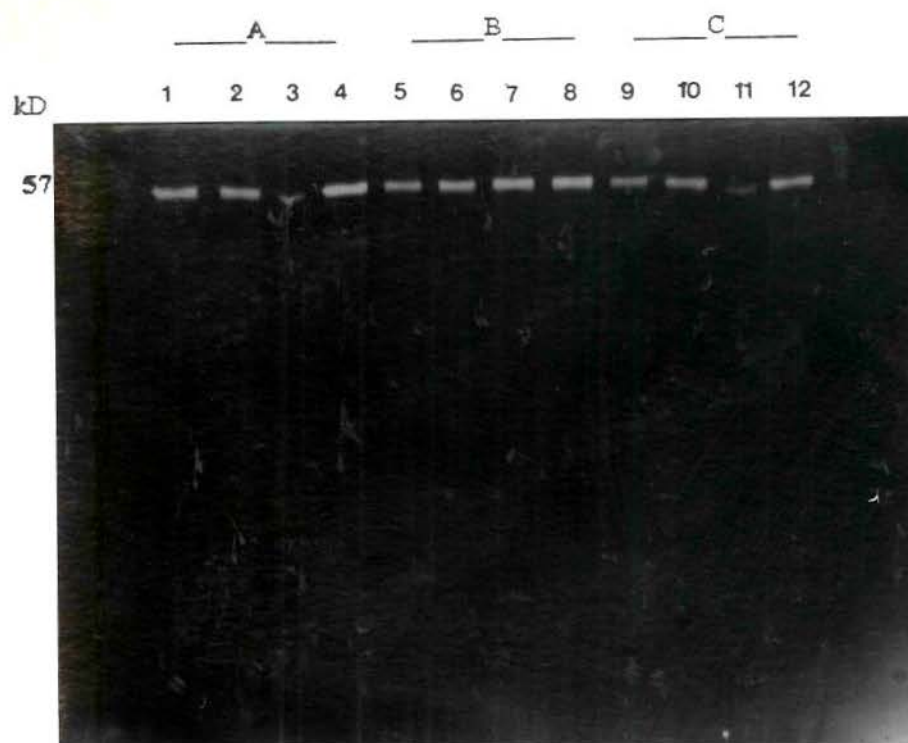


Figura 13. Zimograma das linhagens A (1 a 4), B (5 a 8) e C (9 a 12) mostrando secreção de gelatinase após 48 h. em cultura. Fibroblastos controles (sem CsA - 1, 5 e 9), CsA 250 ng/ml (2, 6 e 10), CsA 500 ng/ml (3, 7 e 11), CsA 1.000 ng/ml (4, 8 e 12). Nas canaletas 3 e 11 ocorreu extravasamento das amostras de sobrenadante.

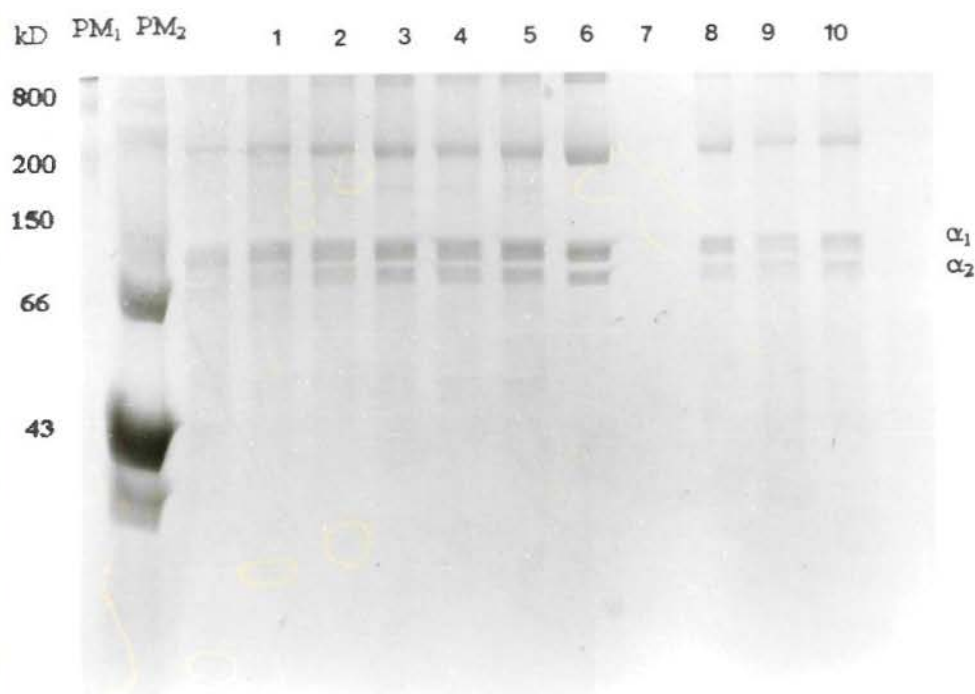


Figura 14. Eletroforese em gel gradiente (5 a 15%) de poliacrilamida para ensaio de ativação de collagenase do sobrenadante de fibroblastos da linhagem F (fibromatose) incubados com CsA (500 ng/ml) durante 72 h. Substrato de colágeno tipo I em PBS (1); substrato de colágeno em PBS com tripsina 100 $\mu\text{g/ml}$ (2); 33,3 $\mu\text{g/ml}$ (3); 11,1 $\mu\text{g/ml}$ (4) e 3,7 $\mu\text{g/ml}$ (5). S^o renadante com substrato de colágeno tipo I sem tripsina (6); sobrenadante com substrato de colágeno tipo I e tripsina 100 $\mu\text{g/ml}$ (7); 33,3 $\mu\text{g/ml}$ (8); 11,1 $\mu\text{g/ml}$ (9) e 3,7 $\mu\text{g/ml}$ (10). PM₁ (laminina/nidogênio), PM₂ (BSA e albumina de ovo).

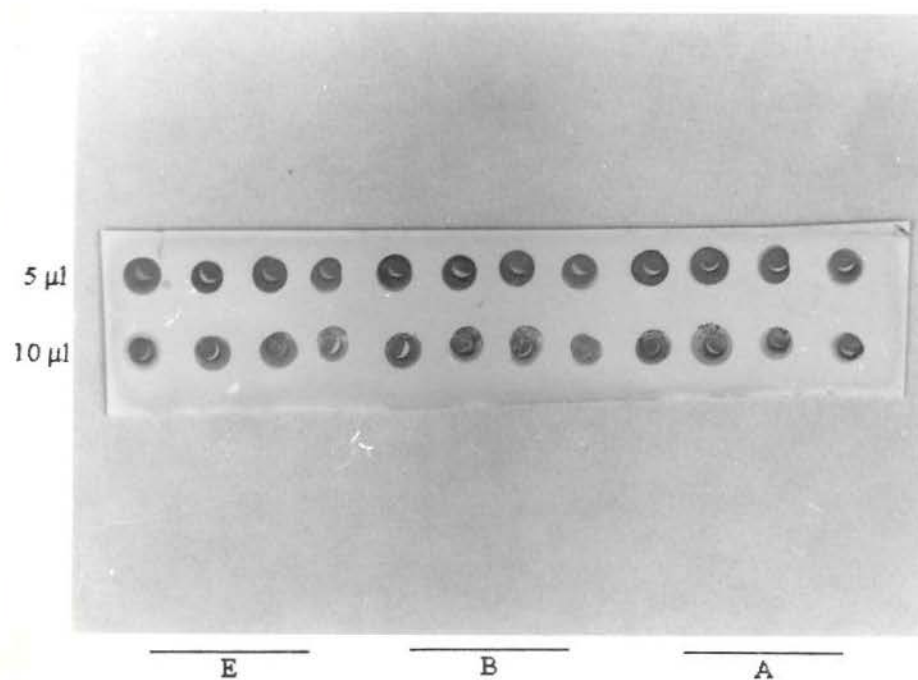


Figura 15. "Dot blot" anti-fibronectina de sobrenadante (5 µl/dot e 10 µl/dot) de fibroblastos das linhagens E (1 a 4), B (5 a 8) e A (9 a 12). Fibroblastos controle (sem CsA - 1, 5 e 9), CsA 250 ng/ml (2, 6 e 10), CsA 500 ng/ml (3, 7 e 11) e CsA 1.000 ng/ml (4, 8 e 12).

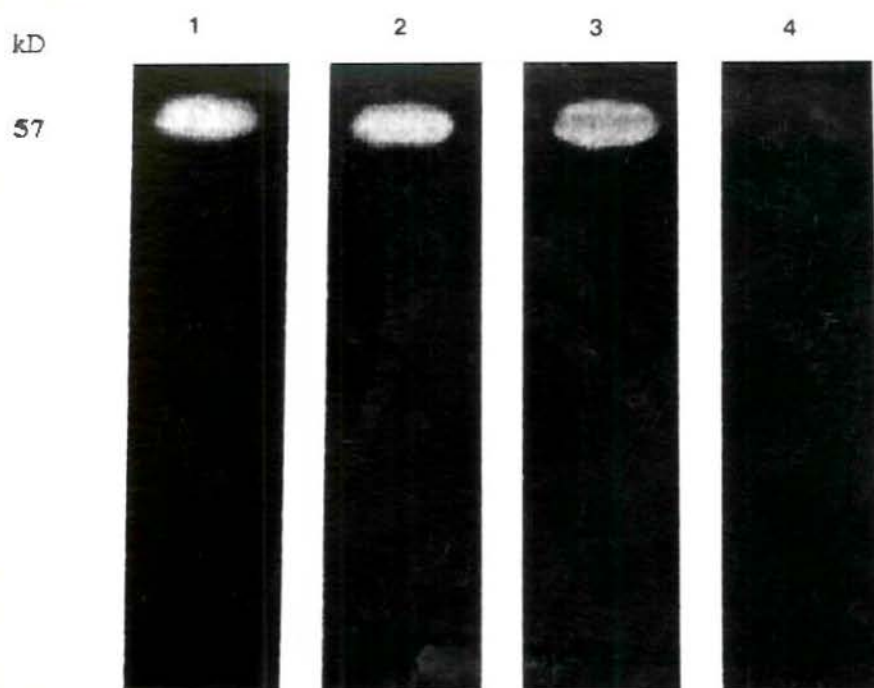


Figura 16. Zimograma para ensaio de inativação de metaloproteinase em sobrenadante de cultura de fibroblastos da linhagem F (fibromatose) após 72 h. de incubação com CsA 500 ng/ml. (1) tampão convencional para zimograma; (2) EDTA 0,5 mM; (3) PMSF 0,5 mM; (4) fenantrolina 0,5 mM.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A CsA causa fibromatose gengival, mas seu mecanismo de ação ainda não é muito bem conhecido, podendo atuar direta ou indiretamente sobre os fibroblastos.

Os fibroblastos constituem uma população celular funcionalmente heterogênea, e a composição dos tecidos conjuntivos resulta de uma mistura de subpopulações. Tem sido sugerido que doenças do tecido conjuntivo resultem de uma seleção de subpopulações específicas de fibroblastos caracterizados por aspectos funcionais que levam a modificações da matriz extracelular, que podem ser refletidas pelas manifestações clínicas da doença (Hassell, 1981; McCulloch e Bordin, 1991; McKevitt e Irwin, 1995).

Em indivíduos susceptíveis, estímulos ambientais, incluindo drogas como a CsA, podem selecionar subpopulações de fibroblastos funcionalmente distintas com índice proliferativo aumentado e produção anormalmente elevada de proteínas de matriz extracelular (Tipton e cols., 1991).

Os fibroblastos residentes regulam a renovação da matriz extracelular do tecido conjuntivo e desempenham papel central na patogênese da fibromatose gengival. A nifedipina concentra-se nos

tecidos gengivais e a fibromatose pode resultar de um efeito direto da droga sobre os fibroblastos residentes, talvez pela capacidade das células se ligarem à droga ou metabolizarem a mesma; o que eventualmente não ocorre com a CsA (McKevitt e Irwin, 1995).

Contagem, teste de viabilidade, morfologia celular e proteínas de matriz extracelular

No presente estudo, verificou-se que a CsA, nas concentrações de 250, 500 e 1.000 ng/ml, não foi citotóxica após 72 h. em cultura. O número de fibroblastos por ml de sobrenadante após 48 h. em cultura não apresentou diferenças estatisticamente significantes para todas as concentrações de CsA. Isto ocorreu nas seis linhagens estudadas. Embora o número de células semeado em cada poço tenha sido o mesmo ($2,5 \times 10^4$), observou-se entre as linhagens controle após 48 h. em cultura, uma variação em relação ao número de células/ml, que foi estatisticamente significativa para as linhagens E e F (fibromatose gengival) como é mostrado na figura 7. Esta variabilidade na recuperação das células após tripsinização e contagem em câmara de Neubauer pode ser explicada pelo fato de que parte das células permaneceu aderida à parede dos poços. Além disso, pode ter ocorrido diferenças no grau de destacamento celular entre as linhagens. As diferenças observadas entre o número de células recuperadas após 48 h. em cultura não devem ser consideradas quando se analisa as figuras 8,

9, 10, 11, 12, 13 e 15, porque nestes ensaios, o sobrenadante não foi proveniente do mesmo experimento feito para a contagem celular. Realizando estudos *in vitro*, Schincaglia e cols. (1992) analisaram os efeitos da CsA nas concentrações de 100, 500 e 1.000 ng/ml na incorporação de timidina, produção de colágeno e níveis de RNA mensageiro, sendo que os resultados indicaram estimulação direta da CsA sobre a síntese de colágeno em fibroblastos gengivais. De acordo com os resultados destes mesmos autores, quando os fibroblastos foram observados em microscópio de contraste de fase, houve diferenças morfológicas consideráveis entre as células tratadas com CsA nas concentrações de 100, 500 e 1.000 ng/ml. As alterações morfológicas acima referidas não foram descritas pelos autores. Como no presente estudo, as concentrações de CsA usadas por Schincaglia e cols. (1992), não alteraram a viabilidade celular, que foi avaliada por coloração com azul de Trypan.

A observação de que nem todos os pacientes tratados com CsA desenvolvem fibromatose gengival sugere que há uma variação interindividual na resposta direta dos fibroblastos à CsA (Tipton e cols., 1991). Em 1988, Hassell e cols. mostraram que linhagens de fibroblastos de diferentes indivíduos exibiram variação na síntese de proteínas em resposta à CsA. Observou-se no presente trabalho, que em relação à síntese de proteína total houve padrão heterogêneo de resposta em função da variação na

concentração de CsA, tanto para os fibroblastos de gengiva normal quanto para os fibroblastos de fibromatose gengival hereditária.

Willhershhausen-Zönnchen e cols. (1992) realizaram estudo incubando fibroblastos gengivais com CsA na concentração de 1.000 ng/ml, e verificaram que após 72 h. não houve alteração significativa no número de células. Entretanto, após o período experimental de 6 semanas, a CsA estimulou significativamente a proliferação celular e a síntese de glicosaminoglicanos. Os autores consideram estes resultados como evidência da estimulação direta da CsA sobre a proliferação de fibroblastos gengivais, o que explicaria em parte, o desenvolvimento das fibromatoses gengivais induzidas por esta droga.

No estudo comparativo de McKevitt e Irwin (1995) houve diferenças fenotípicas entre dois tipos linhagens celulares, sendo que as células provenientes de linhagens de tecido gengival fibromatoso induzido por nifedipina mostraram maior potencial proliferativo e produção de níveis aumentados de proteínas quando comparadas com as linhagens de gengiva não aumentada. A adição de nifedipina em cultura (1.000 ng/ml) não produziu efeito sobre as células da gengiva normal, mas induziu resposta inibidora significativa na proliferação das células da gengiva hiperplásica. Estes achados fundamentam o conceito de que, nos aumentos gengivais induzidos por nifedipina, assim como nos casos de fibromatose gengival induzida por CsA, há fibroblastos sensíveis

aos efeitos desta droga, mas surpreendentemente a nifedipina *in vitro* (1.000 ng/ml) teve efeito inibidor sobre os fibroblastos de gengiva hiperplásica em relação à proliferação celular e síntese de proteínas de matriz extracelular.

James e cols. (1995) estudaram os efeitos da CsA *in vitro* (1 a 10.000 ng/ml) sobre 6 linhagens de fibroblastos gengivais, usando concentrações que variaram de 1 a 10.000 ng/ml, e avaliaram a proliferação e a síntese de proteínas da matriz extracelular. Estes autores verificaram que a CsA não teve nenhum efeito significativo sobre a proliferação das células e sobre a síntese de proteínas da matriz extracelular. Sugerem portanto, que talvez *in vivo*, a droga não influencie diretamente o metabolismo dos fibroblastos, mas atue através de vias indiretas associadas à liberação local de mediadores da inflamação ou produtos bacterianos. Isto reforça observações sobre o fato de que a fibromatose gengival induzida por CsA ocorra com maior frequência, ou se desenvolva mais facilmente em locais onde há maior acúmulo de placa bacteriana, e conseqüentemente, maior grau de resposta inflamatória.

Atividade colagenolítica

Para a confirmação de que estas metaloproteinases neutras obtidas em cultura representaram realmente colagenase liberada no meio extracelular, foram feitos ensaios de atividade colagenolítica. O substrato específico foi o colágeno tipo I extraído do tendão da cauda de ratos.

Os zimogramas mostraram que as linhagens celulares secretaram metaloproteinases com atividade gelatinolítica, sendo que as bandas mais fracas e de menor peso molecular possivelmente representavam formas ativadas da mesma metaloproteinase, provavelmente colagenase, que migrou com maior peso molecular (aproximadamente 57 kD), ou então representavam outras enzimas também capazes de digerir gelatina. A possível presença de outras enzimas além da colagenase, pode ser fundamentada pelo estudo da atividade colagenolítica das metaloproteinases, visto que as moléculas integras de colágeno tipo I foram primeiro clivadas por uma colagenase ativada pela tripsina e a digestão do substrato colagenoso foi completa, não se visualizando bandas correspondentes aos fragmentos $\frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$, devido à suposta presença de outras enzimas no meio extracelular com habilidade para degradar moléculas de colágeno já clivadas em polipeptídeos menores pela colagenase humana que atua clivando a molécula íntegra em um único ponto, originando como produto

dois fragmentos de pesos moleculares diferentes, correspondentes a $\frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$ do peso molecular das cadeias α do colágeno.

A tripsina digeriu apenas pequena quantidade de colágeno tipo I (fig. 13, colunas 2, 3, 4 e 5), pois este estava bastante purificado em nosso experimento, ou seja, era composto predominantemente por moléculas íntegras, pois se estivessem desnaturadas sofreriam ação de outras enzimas antes da ativação da collagenase. As moléculas íntegras de colágeno têm sua digestão iniciada exclusivamente pela ação específica da collagenase atuando num único ponto da cadeia α , local que apresenta uma fragilidade na estrutura da tripla hélice (Piez e Reddi, 1984).

Os sobrenadantes aos quais foi adicionado tripsina nas concentrações finais de 33,3, 11,1 e 3,7 $\mu\text{g/ml}$ mostraram discreta atividade collagenolítica, o que sugere que nestas concentrações, a tripsina ativa apenas pequena quantidade de collagenase, resultando na digestão parcial do substrato de colágeno tipo I.

Entre as linhagens celulares estudadas não incubadas com CsA, observou-se variabilidade em relação à secreção de collagenase no meio extracelular. Tipton e cols. (1991) investigou a susceptibilidade de 14 linhagens à CsA, em relação ao seu comportamento collagenolítico e constatou padrão heterogêneo na resposta collagenolítica entre as linhagens, observando também variações significativas entre subpopulações da mesma linhagem.

Além disso, nossos resultados não mostraram variação na secreção de colagenase na presença de diferentes concentrações de CsA, sendo que Zebrowski e cols. (1988), relataram que a CsA, nas concentrações de 250 ng/ml e 500 ng/ml não exerce efeito sobre a atividade colagenolítica de fibroblastos gengivais humanos normais, e sugere que a atividade colagenolítica não desempenha papel significativo nos aumentos gengivais induzidos por drogas. De acordo com Tipton e cols. (1991), o efeito da CsA sobre a atividade colagenolítica aparentemente depende do doador da amostra, da presença de subpopulações celulares susceptíveis e da concentração da droga. Sendo assim, pode-se considerar que as linhagens analisadas neste trabalho não foram susceptíveis à ação da CsA em relação à síntese de colagenase e de fibronectina.

Colagenase

Além de atuar sobre as células T, a CsA *in vitro* pode atuar sobre fibroblastos gengivais aumentando a produção de colagenase (Schincaglia e cols., 1992). Há evidências de que a degradação, assim como a síntese desempenham papel fundamental na homeostase do colágeno (Hassell, 1982; Geoffrey, 1987).

A colagenase é uma enzima de importância crucial para a função dos órgãos e sistemas dos mamíferos, sendo específica e indispensável para a iniciação da sua degradação (Bauer e cols., 1975).

A collagenase tem sido envolvida na fisiopatologia de doenças genéticas e adquiridas, portanto, o estudo da expressão da collagenase *in vitro* é importante para a interpretação de estudos sobre doenças em que esta enzima esteja associada à etiopatogenia; como é sugerido para os casos das condições fibrosas como as fibromatoses gengivais em que poderia haver deficiência na produção da enzima ou na função da mesma.

Em todas as linhagens celulares analisadas neste estudo, detectou-se a presença de uma gelatinase com peso molecular entre 43 e 66 kD, cujo peso molecular provável é 57 kD, e que deve corresponder à collagenase de fibroblastos gengivais. Esta collagenase deve ser uma pró-enzima (Murphy e cols., 1987). Observou-se também, uma banda fraca bastante próxima da anterior que pode corresponder a uma forma ativada da pró-enzima citada, cujo peso molecular pode ser de 53 kD de acordo com Chin e cols. (1985).

Os resultados de McKevitt e Irwin (1995), mostraram que a nifedipina também não exerceu qualquer efeito sobre as células da gengiva normal após quatro dias em cultura, semelhante ao que ocorreu neste trabalho em relação à síntese de collagenase quando as linhagens foram incubadas com CsA em diferentes concentrações.

Geralmente, embora haja variação, parece ocorrer correlação entre a atividade colagenolítica e a síntese de inibidor tecidual de metaloproteinase, ou seja, a atividade da colagenase e portanto, a degradação do colágeno depende do equilíbrio local entre a concentração da enzima e seus inibidores (Dean e cols., 1989; Ito e cols., 1990; Tipton e cols., 1991).

Os fibroblastos gengivais humanos, como os de outros tecidos, sintetizam colágeno e várias metaloproteinases como a colagenase e também um inibidor de metaloproteinase tecidual denominado TIMP (Vaes, 1971; Heath e cols., 1982; Fan e Scott, 1989). Alguns estudos indicam que o mecanismo de regulação que protege o colágeno recém-sintetizado da hidrólise imediata, está relacionado ao fato da enzima ser liberada como zimogênio. É possível que esta enzima na forma de zimogênio possa ser na realidade um complexo extracelular formado pela ligação da enzima com um inibidor tecidual (Eisen e cols., 1970; Harper e Gross, 1972; Oronski e cols., 1973).

Tipton e cols. (1991) observaram padrão heterogêneo entre atividade colagenolítica de subpopulações da mesma linhagem, principalmente em razão do aumento do inibidor tecidual de metaloproteinase do que propriamente da diminuição da produção de colagenase.

No presente trabalho não foi realizada análise do TIMP. As dificuldades técnicas para se trabalhar com esta proteína só

puderam ser contornadas recentemente com o surgimento de técnicas avançadas de biologia molecular como a reação de polimerização em cadeia por transcrição reversa (RT-PCR) que permite a detecção de RNA mensageiro para TIMPs que são sintetizados em quantidades muito reduzidas (Nomura e cols., 1993).

No presente estudo, a collagenase foi ativada por tripsina, visto que provavelmente esta é a forma mais eficiente e também mais empregada para promover a ativação da collagenase, que é liberada no meio extracelular na forma de pró-enzima (Vaes, 1971; Murphy e cols. 1987). De acordo com Vaes (1971) quando ocorre a ativação da collagenase pela tripsina, o peso molecular da collagenase latente em tecido ósseo de 105 kD é reduzido por clivagem para 84 kD. De acordo com o mesmo autor, a latência da collagenase provavelmente não se deve à formação de um complexo enzima-inibidor, visto que o inibidor possui peso molecular de aproximadamente 120 kD, que é incompatível com a diferença de peso molecular entre a forma latente e a forma ativa.

A interleucina-1 tem elevada capacidade para induzir células do tecido conjuntivo em cultura de órgãos a reabsorver matriz extracelular (Saklatvala e cols., 1984; Bunning e cols., 1986). Tem sido confirmado que a interleucina-1, particularmente

a forma β , e o meio condicionado por células mononucleares fagocitárias tratadas com endotoxina bacteriana são capazes de estimular fibroblastos gengivais a produzir enzimas colagenolíticas e prostaglandina E_2 (PGE_2) (Heath e cols., 1982; Heath e cols., 1987; Richards e Rutherford, 1988; Dinarello, 1988; Richards e Rutherford, 1990; Alvares e cols., 1995), sendo que o pico de estimulação ocorre no período de 48 h. e decresce no período de 96 h., onde o nível de mRNA é menor (Richards e Rutherford, 1990). Por outro lado, sabe-se que a CsA pode inibir a síntese de interleucina 1, portanto, se os efeitos da interleucina 1 *in vitro* ocorressem *in vivo*, poderia-se sugerir que um dos mecanismos de indução da fibromatose gengival por CsA fosse a inibição da produção da interleucina-1 e redução do estímulo para o aumento da síntese de enzimas colagenolíticas e conversão da pro-colagenase em colagenase.

Os dados destes autores sugerem que a possível destruição das fibras do tecido periodontal podem resultar *in vivo* da ação da interleucina-1 sobre os fibroblastos gengivais, visto que recentemente foi detectada a presença de interleucina-1 no fluido do sulco gengival e na gengiva humana (Charon e cols., 1982; Tracey e cols., 1988; Jandinsky e cols., 1988).

Há hipóteses de que a perda de adesão do tecido conjuntivo gengival é mediada por metaloproteinases como a

colagenase e estromelisina, liberadas pelas próprias células do periodonto, a destruição de tecido periodontal pode ser induzida pela interleucina-1 secretada por várias células que compõem o periodonto. Tem sido relatado que a interleucina-1 estimula muito mais a atividade colagenolítica dos fibroblastos gengivais do que a dos fibroblastos do ligamento periodontal (Meikle e cols., 1986; Richards e Rutherford, 1988; Dinarello, 1988).

Fibronectina

Romanos e cols. (1993) sugerem a partir de seus estudos, que a fibronectina desempenha importante papel na composição da matriz extracelular de tecidos normais, podendo revelar alterações metabólicas presentes no aumento de volume gengival. Entretanto, no presente trabalho não foram encontradas diferenças na síntese de fibronectina no meio extracelular entre linhagens de gengiva normal e de fibromatose gengival hereditária, e não foi observada variação na síntese desta proteína quando as células foram incubadas com CsA nas concentrações de 250, 500 e 1.000 ng/ml. Portanto, com base nestas informações, talvez fosse interessante a realização de estudos com o objetivo de avaliar a presença de interleucina-1 presente na gengiva de portadores de fibromatose induzida por CsA.

Inativação de metaloproteinase

A collagenase é uma metaloproteinase, visto que para degradar o substrato necessita da presença de Zn^{++} e Ca^{++} . Os ensaios de inativação de metaloproteinase confirmaram a natureza das enzimas detectadas nos zimogramas, pois a fenantrolina, um agente quelante de Zn^{++} , inibiu a atividade enzimática. A fenantrolina 0,5 mM foi suficiente para inibir completamente a atividade da collagenase. Isto provavelmente se deve ao fato da fenantrolina ser quelante específico de zinco enquanto que o EDTA quela íons divalentes. Sabe-se que a molécula de collagenase está associada a íons Zn^{++} e Ca^{++} necessários para a sua função. Assim, maior quantidade de EDTA seria requerida para quelar todo o Zn^{++} e Ca^{++} do que de fenantrolina que quelaria apenas Zn^{++} .

A incubação com CsA *in vitro* não modificou a proliferação celular, nem a síntese de proteínas de matriz extracelular como a fibronectina e a collagenase. Entretanto, resultados de estudos clínicos sugerem que *in vivo* a incidência e severidade da fibromatose gengival em pacientes tratados com CsA dependem da interação entre vários fatores como controle de placa, grau de inflamação e extensão da destruição periodontal, dosagem e duração da terapia com CsA, concentrações teciduais e plasmáticas da droga e seus metabólitos, idade do paciente e talvez algum comprometimento sistêmico subjacente (Seymour e Jacobs, 1992).

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. Quando incubadas com diferentes concentrações de CsA, as linhagens de fibromatose gengival hereditária e de gengivas normais comportaram-se em cultura, de forma semelhante em relação à contagem de células, síntese de collagenase e de fibronectina.

2. A CsA não alterou a viabilidade celular, mas provocou modificações morfológicas nas linhagens incubadas com CsA na concentração de 1.000 ng/ml, após 72 h.

3. Tanto as linhagens de fibroblastos de gengiva normal como de fibromatose gengival hereditária apresentaram comportamento variável em relação à síntese de proteína total na presença de diferentes concentrações de CsA.

4. A collagenase detectada nos zimogramas apresentou 57 kD e capacidade para digerir colágeno tipo I após 60 min. de ativação por tripsina.

SUMMARY

SUMMARY

Gingival fibromatosis may be hereditary or drug-induced. The disease features suggests that gingival fibroblasts produce high levels of extracellular matrix. The activity of the fibroblasts of gingival fibromatosis cyclosporin A-induced may be influenced by direct action of the drug on cell function. The effects of 3 different cyclosporin A (CsA) concentrations on morphology, collagenase and fibronectin synthesis and collagenolytic activity were studied *in vitro* using 6 fibroblasts strains, 3 of normal gingiva and 3 of hereditary gingival fibromatosis. Cells were cultured with medium containing CsA (250, 500 and 1.000 ng/ml) during 24, 48 and 72 h.. The medium was collected and submitted to enzymographic and collagenolytic activity assays. The fibronectin synthesis was studied by dot blot analysis. Total protein synthesis was studied through electrophoretic analysis. Cellular viability was not changed by the different concentrations of CsA. After 72 h. with 1.000 ng/ml of CsA, all strains showed morphologic changes. Cellular density was determined by Neubauer chamber and no significative differences on proliferation were found between the strains when incubated with different concentration of CsA. The enzymographic assay of sample without incubation with CsA showed heterogeneity on collagenase secretion. The higher amount of enzyme was detected after 72 h. No difference was observed in the feature of collagenase and fibronectin secretion when comparing normal and hereditary gingival fibromatosis cells treated with different

concentrations of CsA after 48 h.. Collagen I substrate was completely digested by activated collagenase present in supernatant collected after 72 h. of CsA incubation. The normal gingival fibroblasts and the hereditary gingival fibroblasts showed similar response in regard to proliferation, collagenase and fibronectin synthesis and collagenolytic activity. On the other hand, the cellular behaviour showed a variation in regard to total protein synthesis.

Key words: gingival fibromatosis, cyclosporin A, gingival fibroblasts.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 001-ABE S, NAGAI YJ Evidence for the presence of collagenase with α_2 -macroglobulin in human rheumatoid synovial fluid: a possible regulatory mechanism of collagenase activity in vitro. *Biochem* 1973;73: 897-900.
- 002-ADACHI Y, NOHARA H Separation and partial characterization of three forms of collagenase inhibitor from bovine gingiva. *Archs Oral Biol* 1989; 34: 431-436.
- 003-ALEXANDER SS, COLONNA G Jr, YAMADA KM, PASTAN I, EDELHOCH H Molecular properties of a major cell surface protein from chick embryo fibroblasts. *J Biol Chem* 1978; 253: 5820-5824.
- 004-ALEXANDER SS, COLONNA G Jr, EDELHOCH H The structure and stability of human plasma cold insoluble globulin. *J Biol Chem* 1979; 254: 1501-1505.
- 005-ALEXANDER AG, BARNES NC, KAY AB Trial of cyclosporine in corticosteroid dependent chronic severe asthma. *Lancet* 1989; 339: 324.
- 006-ALI IU, HYNES RO Effects of LETS glycoprotein on cell motility. *Cell* 1978; 14: 439-446.

- 007-ALVARES O, KLEBE R, GRANT G, COCHRAM DL Growth factor effects on the expression of collagenase and TIMP-1 in periodontal ligament cells. *J Periodontol* 1995; 66: 552-558.
- 008-AMERIO P, GRAVANTE M, ANDREASSI M, MASCI S Cyclical immunotherapy in patients with psoriasis. *Acta Derm Veneoreol* 1994; (suppl. 186): 101-102.
- 009-ANGELOPOULOS AP Diphenylhydantoin gingival hyperplasia. A clinicopathological review. I. Incidence, clinical features and histopathology. *Can Dent Assoc J* 1975; 41: 176-184.
- 010-ATHERTON BJ, HYNES RO A difference between plasma and cellular fibronectins located with monoclonal antibodies. *Cell* 1981; 25: 133-141.
- 011-BALLARD JBA, BUTLER WA Proteins of the periodontum. Biochemical studies on the collagen and non-collagenous proteins of human gingival. *J Oral Pathol* 1974; 3: 176-184.
- 012-BAUER EA, EISEN AZ, JEFFREY JJ Regulation of vertebrate collagenase activity *in vivo* an *in vitro*. *Invest Dermatol* 1972; 59: 50-55.

- 013-BAUER EA, EISEN AZ, JEFFREY JJ Radioimmunoassay of human collagenase. Specificity of the assay and quantitative determination of *in vivo* and *in vitro* human skin collagenase. *J Biol Chem* 1972; 247: 6679-6685.
- 014-BAUER EA, STRICKLIN GP, JEFFREY JJ, EISEN AZ Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Comm* 1975; 64: 232-240.
- 015-BAUER, EA Cell culture density as a modulator of collagenase expression in normal human fibroblast cultures. *Exper Cell Res* 1977; 107: 269-276.
- 016-BAUM BJ, WRIGHT WE Demonstration of fibronectin as a major extracellular protein of human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 1980; 59: 631-637.
- 017-BECKER J, SCHUPPAN D, HAHN EG, ALBERT G, REICHART P The immunohistochemical distribution of collagens type IV, V, VI and laminin in the human oral mucosa. *Arch Oral Biol* 1986; 31: 179-186.
- 018-BENNETT WM, NORMAN DJ Action and toxicity of cyclosporine. *Annu Rev Med* 1986; 37: 215-224.

- 019-BIRKEDAL-HANSEN H, COOB CM, TAYLOR RE, FULLMER HM
Synthesis and release of procollagenase by cultured fibroblast. *J Biol Chem* 1976; 251: 3162-3168.
- 020-BOONE TC, JOHNSON MJ, De CLERCK YA, LANGLEY KE cDNA
cloning and expression of a metalloproteinase inhibitor related to
tissue inhibitor of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;
87: 2800-2804.
- 021-BOREL JF Comparative study in vitro and in vivo drug effects on cell-
mediated cytotoxicity. *Immunology* 1976; 31: 631,.
- 022-BOREL JF, FEURER C, GUBLER HV Biological effects of cyclosporin A:
a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 1976; 6: 468-475.
- 023-BOREL JF, FEURER C, MAGNÉE C, STÄHELIN H Effects of the new
anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology*
1977; 32: 1117-1125.
- 024-BOREL IF, LAFFERTY RI Basic science summation. *Transplant Proc*
1983; 15: 3097.
- 025-BORNSTEIN P, SAGE H Structural distinct collagen types. *Biochem*
1980; 49: 957-1003.

- 026-BOS JD Cyclosporin and alternative cyclical immunosuppressants in psoriasis. *Acta Derm Venereol* 1994; (suppl. 186): 103.
- 027-BOZZO L, ALMEIDA OP, SCULLY C, ALDRED MJ Hereditary gingival fibromatosis: report of an extensive four-generation pedigree. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78: 452-454.
- 028-BRECHTEL B, WELLENREUTHER U, TOPPE E, CZARNETZKI BM Combination of etretinate with cyclosporine in the treatment of severe recalcitrant psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30: 1023-1024.
- 029-BREDFELDT GW Phenytoin-induced hyperplasia found in edentulous patients. *J Am Dent Assoc* 1992; 123: 61-64.
- 030-BRYNSKOV S, FREUND L, CAMPANINI MC KAMPMANN JP Cyclosporine pharmacokinetics after intravenous and oral administration in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 961-967.
- 031-BUNJES HD, HARDT C, HOLLINGHOFF M, WAGNER H Cyclosporin A mediates immunosuppression of primary cytotoxic T cell responses by impairing the release of interleukin-1 and interleukin-2. *Eur J Immunol* 1981; 11: 657.

- 032-BUNNING RAD, RICHARDSON HJ, CRAWFORD A et al. The effect of interleukin-1 on connective tissue metabolism and its relevance to arthritis. *Agents and Actions* 1986; 18: 131-151.
- 033-BURCKHARDT JJ, GUGGENHEIM B Cyclosporin A: *in vivo* and *in vitro* suppression of rat T lymphocyte function. *Immunology* 1979; 36: 753.
- 034-CALNE RY, ROLLES K, WHITE DJG, THIRU S, EVANS DB, HENDERSON R, HAMILTON DL, BOONE N, McMASTER P, GIBBY O, WILLIAMS R Cyclosporine A in clinical organ grafting. *Transpl Proc* 1981; 13: 349-358.
- 035-CARMICHAEL DF, SOMMER A, TOMPSON RC et al. Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2407-2411.
- 036-CHARON JA, LUGER TA, MERGENHAGEN SE, OPPENHEIM JJ Increased thymocyte-activating factor in human gingival fluid during gingival inflammation. *Infect Immunity* 1982; 38: 1190-1198.
- 037-CHAVRIER C, COUBLE ML, MAGLOIRE H, GRIMAUD JA Connective tissue organization of healthy human gingiva. *J Periodont Res* 1984; 19: 221-229.

- 038-CHO ML, LEE YL, GARANT PR Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in beagle periodontum. Collagen type I and III in healthy gingival connective tissue. *J Periodont Res* 1987; 22: 313-319.
- 039-CLARK S, WILHELM S, STRICKLIN G, WELGUS H Coregulation of collagenase and collagenase inhibitor production by phorbol myristate acetate in human skin fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 1985; 241: 36-44.
- 040-COLLAN Y, RANTA H, VARTIO T, PERHEENTUPA J, RAESTE AM Histochemical and biochemical study of hereditary fibrous hyperplasia of the gingiva. *Scand J Dent Res* 1982; 90: 20.
- 041-CUNNINGHAM C, WHITING PH, BURKE MD, WHEATLEY DN, SIMPSON JG Increasing the hepatic metabolism of cyclosporine abolishes nephrotoxicity. *Transpl Proc* 1983; 15: 2712-2715.
- 042-DALEY TD, WYSOCKI GP, MAY C Clinical and pharmacological correlations in cyclosporin-induced gingival hyperplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986; 62: 417.
- 043-DALLAS BM Hyperplasia of the oral mucosa in an edentulous epileptic. *NZ Dent J* 1963; 59: 54-55.

- 044-DARLING MR, ARENDORF TM, SHAIKH AB, STEPHEN L Gingival hyperplasia of an edentulous alveolar ridge in an edentulous epileptic. A case report. *NZ Dent J* 1986; 84: 114-116.
- 045-DEAN DD, MARTEL-PELLETIER J, PELLETIER J-P, HOWELL DS, WOESSNER JF Jr Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1989; 84: 678-685.
- 046-DELILIER GL, SANTORO F, POLLI N, BRUNO E, FUMAGALLI L, RISCIOTTI E Light and electron microscopy study of cyclosporin A-induced gingival hyperplasia. *J Periodontol* 1986; 57: 771-775.
- 047-DIELGELMANN RF, COHEN IK, GUZELIAN PS Rapid degradation of newly synthesized collagen by primary cultures of adult rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 97: 819-826.
- 048-DINARELLO CA Biology of interleukin-1. *FASEB J* 1988; 2: 108-115.
- 049-DOCHERTY AJP, LYONS A, SMITH BJ, WRIGHT EM, STEPHENS PE, HARRIS TJR Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* 1985; 318: 66-69.

- 050-DOCHERTY AJP, MURPHY G The tissue metalloproteinase family and the inhibitor TIMP: a study using cDNAs and recombinant proteins. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 469-479.
- 051-DOOLEY G, VASAN N Dilantin hyperplasia: a review of the literatures. *J N Z Soc Periodontol* 1989; 68: 19-22.
- 052-DOS REIS GA, SHEVACH EM Effect of cyclosporin-A on T-cell function in vitro: the mechanism of suppression of T-cell proliferation depends on the nature of the T-cell stimulus as well as the differentiation state of the responding T-cell. *J Immunol* 1982; 129: 2360.
- 053-DREYER WP, THOMAS OJ Diphenylhydantoinate-induced hyperplasia of the masticatory mucosa in an edentulous epileptic patient. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 45: 701-706.
- 054-EISEN AZ, GROSS J The role of epithelium and mesenchyme in the production of a collagenolytic enzyme and a hyaluronidase in the Anuran tadpole. *Develop Biol* 1965; 12: 408-418.
- 055-EISEN AZ, JEFFREY JJ, GROSS J Human skin collagenase. Isolation and mechanism of attack on the collagen molecule. *Biochem Biophys Acta* 1968; 151: 637.

- 056-EISEN AZ Human skin collagenase: relationship to the pathogenesis of epidermolysis bullosa dystrophica. *J Invest Dermatol* 1969; 52: 442-448.
- 057-EISEN AZ, BLOCH KJ, SAKAI T Inhibitor of human skin collagenase by human serum. *J Lab Clin Investig* 1970a; 75: 258-263.
- 058-EISEN AZ, BAUER EA, JEFFREY JJ Animal and human collagenases. *J Invest Derm* 1970b; 55: 359-373.
- 059-EISEN AZ, BAUER EA, JEFFREY JJ Human skin collagenase. The role of serum alphaglobulins in the control of activity *in vivo* and *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 248-251.
- 060-ELLIOT JF, LIN Y, MIZEL SB, BEACKEY RC, HARNISH DG, PAETKAU V Induction of interleukin 2 messenger RNA inhibited by cyclosporin-A. *Science* 1984; 226: 1439-1441.
- 061-EMERSON TG Hereditary gingival hyperplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 19: 1-9.
- 062-ENGEL J, ODEMATT E, ENGEL A, MADRI JA, FURTHAMMYR H, ROHDE H, TIMPL R Shapes, domain organization and flexibility of laminin and fibronectin two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *J Med Biol* 1981; 150: 97-120.

- 063-ERICKSON HP, CARRELL N, McDONNAGH J Fibronectin molecule visualized in electron microscopy: a long, thin, flexible strand. *J Cell Biol* 1981; 91: 673-678.
- 064-EVANSON JM, JEFFREY JJ, KRANE SN Studies on collagenase from rheumatoid synovium in tissue culture. *J Clin Invest* 1968; 47: 2639.
- 065-EYRE DR, McDEVITT CA, BILLINGHAM MEJ, MUIR H Biosynthesis of collagen and other matrix proteins by articular cartilage in experimental osteoarthritis. *Biochem J* 1980; 188: 823-837.
- 066-FERGUSON RM, SUTHERLAND DER, SIMMONS RL, et al. Ketoconazole, cyclosporine metabolism and renal transplantation. *Lancet* 1982; 2: 882.
- 067-FINZI AF The modern approach: new combined treatments for psoriasis. *Acta Derm Veneorol* 1994;(suppl. 186): 105-106.
- 068-FREEMAN DJ, LAUPACIS A, KEOWN PA, STILLER CR, CARRUTHERS SG Evaluation of cyclosporine-phenytoin interaction with observations on cyclosporine metabolites. *Br J Clin Pharmacol* 1984;18: 887-893.

- 069-FRISKOPP J, KLINTMALM G Gingival enlargement: a comparison between cyclosporine and azathioprine treated renal allograft recipients. *Swed Dent J* 1986; 10: 85.
- 070-FRY L Long-term cyclosporin therapy for psoriasis. *Acta Derm Venereol* 1994; (suppl. 186): 104.
- 071-FULLMER H, GIBSON W, LAZARUS G, MADEN H, WHEDON K Origin of collagenase in periodontal tissues of man. *J Dent Res* 1969; 48: 63-66.
- 072-FULLMER JM, GIBSON WA, LAZARUS GS, BLADEN HA, WHEDON KA The origin of collagenase in periodontal tissues on man. *J Dent Res* 1980; 48: 646-651.
- 073-GAJARDO J Ciclosporina y psoriasis: experiencia en 14 pacientes. *Rev Med Chile* 1993; 121: 1411-1415.
- 074-GEOFREY LJ Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. *Am J Physiol* 1987; 252: C1-C9.

- 075-GOLDBERG GI, MARMER BL, GRANT GA, EISEN AZ, WILHELM S, HE C Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8207-8211.
- 076-GOLUB LM, SIEGEL N, RAMAMURTHY C, MANDEL I Some characteristics of collagenase activity in gingival crevicular fluid and its relationship to gingival disease in humans. *J Dent Res* 1976; 55: 1049-1057.
- 077-GRANELLI-PIPERNO A, INABA K, STEINMAN RM Stimulation of lymphokine release from T-lymphoblasts. *J Exp Med* 1984; 160: 1792-1802.
- 078-GREEN CJ, ALLISON AC Extensive prolongation of rabbit kidney allograft survival after short term cyclosporin A treatment. *Lancet* 1978; 1: 1182.
- 079-GREENBERG JH, SEPII S, HEWITT AT Role of collagen and fibronectin in neural crest cell adhesion and migration. *Dev Biol* 1981; 87: 259-266.
- 080-GRILLO HC, GROSS J Collagenolytic activity during mammalian wound repair. *Develop Biol* 1967; 15: 300.

- 081-GRINNELL F Fibronectin and wound healing. *J Cell Biochem* 1984; 26: 107-116.
- 082-GUERCKI J, WARTY V, SANGHVI A The transport of cyclosporine in association with plasma lipoproteins in heart and liver transplant patients. *Transpl Proc* 1985; 17: 1997.
- 083-GUPTA AK, BROWN MD, ELLIS CN, ROCHER LL, FISHER GJ, BAADSGAARD O, COOPER KD, VOORHEES JJ Cyclosporine in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 1989; 21: 1245-1258.
- 084-HARDY AM, WAJSZCZUK CP, HAKALA TR, ROSENTHAL JT, STARZL TE, HO M Infection in renal transplant recipients on cyclosporine: *Pneumocystis* Pneumonia. *Transpl Proc* 1983; 15: 2773-2774.
- 085-HARPER E, BLOCH KJ, GROSS J The zimogen of tadpole collagenase. *Biochem* 1971; 10: 3035-3041.
- 086-HARPER E, GROSS J Collagenase, procollagenase and activator relationships in tadpole tissue cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 48: 1147-1152.
- 087-HARRIS ED, KRANE SM Collagenases. *New Engl J Med* 1974; 291: 557-563.

- 088-HARRIS ED, WELGUS HG, KRANE SM Regulation of mammalian collagenases. *Collagen Relat Res* 1984; 4: 493-512.
- 089-HASSELL TM, PAGE RC, NARAYANAN AS, COOPER CG Diphenylhydantoin (Dilantin) gingival hyperplasia: drug-induced abnormality of connective tissue. *Proc Nat Acad Sci USA* 1976; 73: 2909-2912.
- 090-HASSELL TM Evidence for production of an inactive collagenase by fibroblasts from phenytoin-enlarged human gingivae. *J Oral Pathol* 1982; 11: 310-317.
- 091-HASSELL TM, ROMBERG E, SOBHANI S, LESKO L, DOUGLAS R Lymphocyte mediated effects of cyclosporine of human fibroblasts. *Transplant Proc* 1988; 20 (suppl 3): 993-1002.
- 092-HEATH JK, GOWEN M, MEIKLE MC, REYNOLDS JJ Human gingival tissues in culture synthesize three metalloproteinases and a metalloproteinase inhibitor. *J Periodont Res* 1982; 17: 183-190.
- 093-HELIN HJ, EDGINTON TS Cyclosporin-A regulates monocyte macrophage effector functions by affecting instructor T-cells: inhibition of monocyte procoagulant response to allogeneic stimulation. *J Immunol* 1984; 132: 1074.

- 094-HESS AD, DONNENBERG AD, TUTSCHKA PJ, SANTOS GW Effect of cyclosporine-A on human lymphocyte responses *in vitro*. *J Immunol* 1983; 130: 717-721.
- 095-HOROWITZ AL, KELMAN JA, CRYSTAL RG Activation of alveolar macrophage collagenase by a neutral protease secreted by the same cell. *Nature* 1976; 264: 772-773.
- 096-HOUL T Synthesis of collagen and fibronectin in fibroblasts derived from health and hyperplastic gingivae. *J Formos Med Assoc* 1993; 92: 367-372.
- 097-HYNES RO, YAMADA KM Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol* 1982; 95 369-377.
- 098-HUTCHING PR, COOKE A, GUNN HC Murine T-cell suppression demonstrate in the absence of cytotoxicity and the effect of cyclosporin A on this system. *J Immunol* 1983; 130: 1071.
- 099-JAMES JA, IRWIN CR, LINDEN GJ The effects of culture environment on the response of human gingival fibroblasts to cyclosporin A. *J Periodontol* 1995; 66: 339-344.

- 100-JANDINSKY J, LEUNG C, MACEDO B, RYNAR J, DEASEY M
Immunocytochemical localization of interleukin-1 in human gingival
tissue. *J Leukocyte Biol* 1988; 42: 601.
- 101-JEFFERY JR Cyclosporine analogues. *Clin Biochem* 1991; 24: 15-21.
- 102-JOHNSON BM, EL-GUINDY M, AMMONS WF, NARAYANAN S,
PAGE RC A defect in fibroblasts from an unidentified syndrome
with gingival hyperplasia as the predominant feature. *J Periodont
Res* 1986; 21: 403-413.
- 103-JORGESON RJ, COOCKER ME Variation in inheritance and expression
of gingival fibromatosis. *J Periodontol* 1974; 45: 472-477.
- 104-KAHAN BD, VAN BUREN CT, FLECHNER SM, PAYNE WP, BOILE
M, KERMAN RH Cyclosporine immunosuppression mitigates
immunologic risk factors in renal allotransplantation. *Transpl Proc*
1983; 15: 2469-2478.
- 105-KAHAN BD Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cyclosporine.
Transpl Proc 1989; 21: 9.
- 106-KALMAN VK, KLIMPEL GR Effects of cyclosporin on the production of
various interferons. *Transpl Proc* 1983; 15: 2383.

- 107-KAUFMAN Y, CHANG AE, ROBB RJ, ROSENBERG SA Mechanism of action of cyclosporine A: inhibition of lymphokine secretion studied with antigen-stimulated T-cell hybridomas. *J Immunol* 1984; 133: 3107-3011.
- 108-KEMÉNY L, KENDERESSY ASz, OLASZ E, MICHEL G, RUZICKA T, FARKAS B, DOBOZY A. The interleukin 8 receptor: a potential target for antipsoriatic therapy? *Eur J Pharm* 1994; 258: 269-272.
- 109-KEOWN PA, LAUPACIS A, CARRUTHERS G, et al. Interaction between phenytoin and cyclosporine following organ transplantation. *Transplantation* 1984; 3: 304.
- 110-KILPINEN E, RAESTE AM, COLLAN Y Hereditary gingival hyperplasia and physical maturation. *Scand J Dent Res* 1978; 86: 118.
- 111-KOOB TJ, JEFFREY JJ Hormonal regulation of collagen degradation in the uterus: inhibition of collagenase expression by progesterone and cyclic AMP. *Biochem Biophys Acta* 1974; 354: 61-70.
- 112-KOTELIANKY VE, GLUKHOVA MA, BEJANIAN MV, SMIRNOV VN, FILIMONOV VV, ZALITE OM, VENJAMINOV SY A study of the structure of fibronectins. *FEBS (Fed Eur Bioch Soc) Letters* 1981; 119: 619-624.

- 113-KOWASHI Y, JACCARD F, CIMISONI G Increase in free collagenase and neutral protease activities in the gingival crevice during experimental gingivitis in man. *Arch Oral Biol* 1979; 24: 645-650.
- 114-KRUZE D, WOJTECKA E Activation of leucocyte collagenase proenzyme by rheumatoid synovial fluid. *Biochem Biophys Acta* 1972; 285: 436-446.
- 115-KUPIECK-WEGLINSKI JW, FILHO MA, STROM TB, TILNEY NL Sparing of suppressor cells: a critical action of cyclosporine. *Transplantation* 1984; 38: 97-101.
- 116-KUHN C, YU S-Y, CHRAPLYVY M, LINDER HE, SENIOR RM The induction of emphysema with elastase II -Changes in connective tissue. *Lab Invest* 1976; 34: 372-380.
- 117-LABAND PF, HABIB G, HUMPREYS GS Hereditary gingival fibromatosis: report fo an affected family with associated splenomegaly and skeletal and soft tissue anormalities. *Oral Surg Oral Pathol Oral Surg* 1964; 17: 339-351.
- 118-LAZARUS GS, DECKER JL, OLIVER CJ, DANIELS JR, MULTZ CD, FULLMER HM Collagenolytic activity of synovium in rheumatoid arthritis. *New Engl J Med* 1968; 279: 914.

- 119-LEONI P, GARCIA RC, ALLISON AC Effects of cyclosporin A on human lymphocytes in culture. *J Clin Lab Immunol* 1978; 1: 67.
- 120-LILLEHOJ HE, MALEK TR, SHEVACK EM Differential effect of cyclosporin A on the expression of T and B lymphocyte activation antigens. *J Immunol* 1984; 133: 244.
- 121-LINDBLAND WJ, FULLER GC Hepatic collagenase activity during carbon tetrachloride induced fibrosis. *Fundamental Appl Toxicol* 1983; 3: 40-43.
- 122-MACARTNEY HW, TSCHESCHE H Latent collagenase from human polymorphonuclear leucocytes and activation to collagenase by removal of an inhibitor. *FEBS Letters* 1980; 119: 327-332.
- 123-MASRI MA Comparative study of skin graft survival rates in BALB/c mice treated with either cyclosporine A, cyclosporine G, or 1/1 combination of both. *Transpl Proc* 1992; 24: 1661.
- 124-MASUDA K, URAYAMA A, KOGURE M, NAKAJIMA A, NAKAE K, INABA G Double-masked trial of cyclosporin versus colchicine and long-term open study of cyclosporin in Behcet's disease. *Lancet* 1989; 1: 1093-1096.

- 125-MAURER G, URAYAMA A, KOGURE M Double-masked trial of cyclosporin versus colchicine and long-term open study of cyclosporin in Behcet's disease. *Lancet* 1989; 1: 1093.
- 126-McCULLOCH CAG, BORDIN S Role of fibroblast subpopulations in periodontal phisiology and pathology. *J Periodont Res* 1991; 26: 144-154.
- 127-McGAW T, LAM S, COATES J Cyclosporin-induced gingival overgrowth: correlation with dental plaque scores, gingitis scores, and cyclosporin levels in serum and saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987; 64: 293.
- 128-McKEVITT KMB, IRWIN CR Phenotypic differences in growth matrix synthesis and response to nifedipine between fibroblasts derived from clinically healthy and overgrown gingival tissue. *J Oral Pathol Med* 1995; 24: 66-71.
- 129-McKENNA RM, SZTURM K, JEFFERY JR Inhibition of cytokine production by cyclosporine A and G. *Transplantation* 1989; 47: 343.

- 130-MEIKLE MC, HEATH JK, REYNOLDS JJ Advances in understanding cell interactions in tissue resorption. Relevance to the pathogenesis of periodontal diseases and a new hypothesis. *J Oral Pathol* 1986; 15: 239-250.
- 131-MIZUNO T, IGARASHI A, NOHARA H Partial sequencing of two forms of concavalin A-unbound collagenase inhibitor from bovine gingiva. *Archs Oral Biol* 1993; 38: 917-918.
- 132-MODRY DL, STINSON EB, OYER PE, JAMIESON SW, BALDWIN JG, SHYMWAY NE Acute rejection and massive cyclosporine requirements in heart transplant recipients treated with rifampin. *Transplantation* 1985; 39: 313-314.
- 133-MORRIS PJ The impact of cyclosporin A on transplantation. *Adv Surg* 1984; 17: 99.
- 134-MURPHY G, REYNOLDS JJ, WERB Z Biosynthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases by human fibroblasts in culture. Stimulation by 12-tetradecanoylphorbol 13-acetate and interleukin-1 in parallel with collagenase. *J Biol Chem* 1985; 260: 3079-3083.

- 135-NAGASE H, CAWSTON TE, DE SILVA M, BARRET AJ Identification of plasma kalikrein as an activator of latent collagenase in rheumatoid synovial fluid. *Biochem Biophys Acta* 1982; 702: 133-142.
- 136-NARANAYAN AS, PAGE RC Connective tissues of the periodontum a summary of current work. *Collagen and related research clinical and experimental* 1983; 3: 33-64.
- 137-NARANAYAN AS, GLAGETT JA, PAGE RC Effect inflammation on the distribution of collagen types I, III, IV and V and type I trimer and fibronectin in human gingival. *J Dent Res* 1985; 64: 111-116.
- 138-NATHAN RA, HUSSAN MZ, CHOW C, BHATNAGER RS Gingival collagen composition in chronic inflammatory periodontal disease. *J Dent Res* 1979; 58: 762a.
- 139-NOMURA T, TAKAHASHI T, HARA K Expression of TIMP-1, TIMP-2 and collagenase mRNA in periodontitis-affected human gingival tissue. *J Periodont Res* 1993; 28: 354-362.

- 140-NOOMAN KD, NOOMAN NE, YAMADA K Monoclonal antibodies directed against fragments of fibronectin. *J Supramol Struct Cell Biochem* 1981; (suppl 5): 302.
- 141-OIKARINEN K, SALO T, KÄÄR ML, LAHTELA P, ALTONEN M Hereditary gingival fibromatosis associated with growth hormone deficiency. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1990; 28: 335-339.
- 142-OKADA Y, WATANABE S, NAKANISHI I et al Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases by neutrophil elastase and other serine proteinases. *FEBS Lett* 1988; 229: 157-160.
- 143-OKAZAKI I, MARUYAMA K Collagenase activity in experimental hepatic fibrosis. *Nature* 1974; 252: 49-50.
- 144-ORONSKY AL, PERPER RJ, SCHROEDER HC *Nature* 1973; 246: 417-419.
- 145-OVERALL CM, SODEK J Initial characterization of a neutral metalloproteinases, active on native $\frac{3}{4}$ collagen fragments, synthesized by ROS 17/2.8 osteoblastic cells, periodontal fibroblasts and identified in gingival crevicular fluid. *J Dent Res* 1987; 66: 1271-1282.

- 146-OVERALL CM, WRANA JL, SODEK J Induction of formative and resorptive cellular phenotypes in human gingival fibroblasts by TGF- β 1 and concavalin A: regulation of matrix metalloproteinases and TIMP. *J Periodont Res* 1991; 26: 279-282.
- 147-OYER PE, STINSON EB, JAMIESON SW et al. Cyclosporin in cardiac transplantation: A 2^{1/2} year follow up. *Transpl Proc* 1983; 15: 2546.
- 148-PAGE RC, AMMONS WF, SCHECTAMAN LR, DILLINGHAM LA Collagen fibre bundles of the normal marginal gingiva in the marmoset. *Arch Oral Biol* 1974; 19: 1039-1043.
- 149-PALACIOS R, MOLLER G Cyclosporin A blocks receptors for HLA-DR antigens on T cell. *Nature* 1981; 290: 792.
- 150-PHILIPS B, ESHENAUER A, SHULLS A et al. Incidence of cyclosporine-induced gingival overgrowth in renal transplant patients. *J Dent Res* 1988; 67: 322.
- 151-PIEZ KA, REDDI AH *Extracellular matrix biochemistry*. New York/Elsevier Science Publishing Co. 1984.
- 152-POPPELL TD, COLLINS JF Phenytoin induced gingival hyperplasia of edentulous apsced. A case report. *Spec Care Dentist* 1987; 7: 106-107.

- 153-POSTLETHWAIT AE, KESKI-OJA J, BALIAN G, KANG AH Induction of fibroblast chemotaxis by fibronectin: localization of the chemotactic region to a 140,000 molecular weight non-gelatin-binding fragment. *J Exp Med* 1981; 153: 494-499.
- 154-POSTLETHWAIT AE, RAGHOW R, STRICKLIN GP, POPPLETON H, SEYER JM, KANG AH Modulation of fibroblast functions by interleukin-1: increase steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin-1 α and β . *J Cell Biol* 1988; 106: 311-317.
- 155-POWLES RL, CLINK HM, SPENCE D, MORGENSTERN G, WATSON JG, SELBY PJ, WOODS M, BARRETT A, JAMESON B, SLOAN J, LAWLER SD, KAY HEM, LAWSON D, MCELWAIT TJ, ALEXANDER P Cyclosporin A to prevent graft-versus-host disease in man after allogenic bone marrow transplantation. *Lancet* 1980; *i*: 327-329.
- 156-RAMON Y, BEHAR S, KISHON Y, EGELBERT IS Gingival hyperplasia caused by nifedipine: a preliminary report. *Int J Cardiol* 1984; 5: 195-204.

- 157-RATEITSCHAK-PLUSS EM, HEFTI A, LORTSCHER R, THIEL G Initial observation that cyclosporin-A induces gingival enlargement in man. *J Clin Periodont* 1983; 10: 237-246.
- 158-REITZ BA, BIEBER CP, RANEY AA, PENNOCK JL, JAMIESON SW, OYER PE, STINSON EB Orthotopic heart and combined heart and lung transplantation with cyclosporin A immunosuppression. *Transpl Proc* 1981; 13: 393-396.
- 159-RICHARDS D, RUTHERFORD RB The effects of interleukin-1 on collagenolytic activity and prostaglandin E secretion by human periodontal ligament and gingival fibroblast. *Archs Oral Biol* 1988; 33: 237-243.
- 160-ROBERT L, LABAT-ROBERT J Morphogenesis, aging and repair of the connective tissues. *Facial Plastic Surg* 1991; 6: 1-7.
- 161-ROMANOS GE, SCHRÖTER-KERMANI C, HINZ N, HERRMANN D, STRUB JR, BERNIMOULIN JP Extracellular matrix analysis of nifedipine-induced gingival overgrowth: immunohistochemical distribution of different collagen types as well as the glycoprotein fibronectin. *J Periodont Res* 1993; 28: 10-16.

- 162-ROSTOCK MH, FRY HR, TURNER JE Severe gingival overgrowth associated with cyclosporine therapy. *J Periodontol* 1986; 57: 294.
- 163-RYFFEL B, DONATSCH P, MANDORIN M Toxicological evaluation of cyclosporin A. *Arch Toxicol* 1983; 53: 107.
- 164-SAKLATVALA J, PILSWORTH L, SARFIELD S, GAVRILOVIC J, HEATH J Pig catabolin is a form of interleukin-1. Cartilage and bone resorb, fibroblasts make prostaglandin and collagenase, and thymocyte proliferation is augmented in response to one protein. *Biochem J* 1984; 224: 461-466.
- 165-SCHINCAGLIA G.P, FORTINI F, CAVALINI R, PIVA R, CALURA G, del SENNO L Cyclosporin-A increases type I procollagen production and mRNA level in human gingival fibroblast *in vitro*. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 181-185.
- 166-SCHULS BS, MICHEL S, WAGNER S Increased expression of epidermal interleukin 8 receptor in psoriasis. *J Immunol* 1993; 151: 4399.
- 167-SELLERS A, CARTWRIGHT E, MURPHY G, REYNOLDS JJ Evidence that latent collagenase are enzyme-inhibitor complexes. *Biochem J* 1977; 163: 303-307.

- 168-SEPPÄ HEJ, YAMADA KM, SEPPÄ ST, SILVER MH, KLEINMAN HK, SCHIFFMAN E The cell-binding fragment of fibronectin is chemotatic for fibroblasts. *Cell Biol Int Rep* 1981; 5: 813-819.
- 169-SEYMOUR RA, SMITH DG, ROGERS SR The comparative effects of azathioprine and cyclosporin on some gingival health parameters of renal transplant patients. *J Clin Periodont* 1987; 14: 610.
- 170-SEYMOUR RA, SMITH DG The effect of plaque control programme on the incidence and severity of cyclosporin-induced gingival changes. *J Clin Periodont* 1991; 18: 107-116.
- 171-SEYMOUR RA, JACOBS DJ Cyclosporin and the gingival tissues. *J Clin Periodontol* 1992; 19: 1-11.
- 172-SHIRASUNA K, OKURA M, WATATANI K, HAYASHIDO Y, SAKA M, MATSUYA T Abnormal cellular property of fibroblasts from congenital gingival fibromatosis. *J Oral Pathol* 1989; 7: 381-385.
- 173-SINGER SL, GOLDBLATT J, HALLAM LA, WINTERS JC Hereditary gingival fibromatosis with a recessive mode of inheritance. Case reports. *Austr Dent J* 1993; 38: 427-432.

- 174-SONNEVELD P, DURIE BGM, LOKHORST HM et al. Modulation of multidrug-resistant multiple myeloma by cyclosporine. *Lancet* 1992; 340: 255.
- 175-SOORIYAMOORTHY M, GOWER DB, ELEY BM Androgen metabolism in gingival hyperplasia induced by nifedipine and cyclosporin. *J Periodont Res* 1990; 25.
- 176-SPARROW MP Regression of skeletal muscle of chicken wing after stretch-induced hypertrophy. *Am J Physiol* 1982; 242: C333-C338.
- 177-STARZL TE, WEIL R, IWATSUKI S, KLINTMALM G, SCHROTER GPJ, KOEP LJ, IWAKI Y, TERASAKI PJ, PORTER KA The use of cyclosporin A and prednisone in cadaver kidney transplantation. *Surg Gynecol Obstetr* 1980; 151: 17-26.
- 178-STARZL TE, IWATSUKI S, VAN THIEL DH, GARTNER JC, ZITELLI BJ, MALATAK JJ, SCHADE RR, SHAW BW, HAKALA TR, ROSENTHAL JT Report of Colorado-Pittsburg liver transplantation studies. *Transpl Proc* 1983; 15: 2581-2585.

- 179-STETLER-STEVENSON WG, KRUTZSCH HC, LIOTTA LA Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* 1989; 264: 17374-17378.
- 180-STILLER C The Canadian trial of cyclosporine: cyclosporine therapy compared to standard immunosuppression in renal transplants; an exploration of nephrotoxicity. *Transpl Proc* 1983; 15: 2479.
- 181-STOCKLEY RA Proteolytic enzymes, their inhibitors and lung diseases. *Clin Sci Lond* 1983; 64: 119-126.
- 182-STRICKLIN GP, BAUER EA, JEFFREY JJ, EISEN AZ Human skin collagenase: isolation of precursor and active formas from both fibroblast and organ cultures. *Biochemistry* 1977; 16: 1607-1614.
- 183-STRICKLIN GP, EISEN AZ, BAUER EA, JEFFREY JJ Human skin fibroblast collagenase: chemical properties of precursor and active forms. *Biochem* 1978; 17: 2331-2337.
- 184-SUTHERLAND DER, CHINN PL, GOETZ FC, ELICK BA, NAJARIAN JJ Experience with cyclosporine versus azathioprine for pancreas transplantation. *Transplant Proc* 1983; 15: 2606-2612.

- 185-SYRJANEN SM, SYRJANEN KJ Hyperplastic gingivitis in a child receiving sodium valproate treatment. *Proc Finn Dent Res* 1978; 75: 95-98.
- 186-TAKAHASCHI S, DUNN MA, SEIFTER S Liver collagenase in murine achistosomiasis. *Gastroenterology* 1980; 78: 1425-1431.
- 187-THANSON AW, MOON DK, GECZY CL, NELSON DS Cyclosporin A inhibits limphokine production but not the responses of macrophages to linfokines. *Immunology* 1983; 48: 291.
- 188-TIPTON DA, DABBOUS NK Heterogeneity of gingival fibroblast response to cyclosporine. *J Dent Res* 1986; 65: 331.
- 189-TIPTON DA, STRICKLIN GP, DABBOUS MK Fibroblast heterogeneity in collagenolytic response to cyclosporine. *J Cell Biochem* 1991; 46: 152-165.
- 190-TOWPIK E, KUPIEC-WEGLINSKI JW, TILNEY NL The potential use of cyclosporine in reconstructive surgery. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1985; 76: 312.

- 191-TRACEY DE, RICHARD KA, DIEBEL MR, HARDEE MM, CORNETTE JC, JEFFCOAT MK, WILLIAMS RC High levels of interleukin-1 alpha in periodontal crevicular fluid. *J Leukocyte Biol* 1988; 42: 605.
- 192-TREEM WR, HYAM JS Cyclosporine therapy for gastrointestinal disease. *J Pediatric Gastroenterol Nutr* 1994; 18: 270.
- 193-TYLDESLEY WR, ROTTER E Gingival hyperplasia induced by cyclosporin A. *Br Dent J* 1984; 157: 305-309.
- 194-UITTO V-J, RAESTE AM Activation of latent collagenase of human leucocytes and gingival fluid by bacterial plaque. *J Dent Res* 1978; 57: 844-851.
- 195-UITTO V-J, TURTO H, SAXÉN L Extraction of collagenase from human gingiva. *J Periodont Res* 1978; 13: 207-214.
- 196-UITTO V-J, TURTO H, HUTTUNEN A, LINDY S, UITTO J Activation of human leucocyte collagenase by compounds reacting with sulphhydryl groups. *Biochem Biophys Acta* 1980; 613: 168-177.
- 197-UITTO V-J, APPELGREN R, ROBINSON PJ Collagenase and neutral metalloproteinase activity in extracts of inflamed human gingiva. *J Periodont Res* 1981; 16: 417-424.

- 198-UITTO V-J, ELLIOT I, ROBINSON PJ Activation of human gingival collagenase. *J Oral Pathol* 1984; 13: 412-418.
- 199-VAES G Multiple steps in the activation of the inactive precursor of bone collagenase by trypsin. *FEBS (Fed Eur Biochem Soc) Letters* 1972a; 28: 198-200.
- 200-VAES G. The release of collagenase as an inactive proenzyme by bone explants in culture. *Biochem J* 1972b; 126: 275-289.
- 201-VERON MH, COUBLE ML, CAILLOT G, HARTMANN DJ, MAGLOIRE H Expression of fibronectin and type I collagen by human dental pulp cells and gingiva fibroblasts grown on fibronectin substrate. *Arch Oral Biol* 1990; 35: 565-569.
- 202-VIDEMAN T, ERONEN I, CANDOLIN T [³H] proline incorporation and hydroxyproline concentration in articular cartilage during the development of osteoarthritis caused by immobilization. *Biochem J* 1981; 200: 435-440.
- 203-WERB EA, BURLEIGH MC A specific collagenase from rabbit fibroblast in monolayer culture. *Biochem J* 1974; 137: 373-385.

- 204-WERB Z, BURLEIGH MC, BARRET AJ, STARKEY PM The interaction of α_2 -macroglobulin with proteinases. Binding and inhibition mammalian collagenases and other metalloproteinases. *Biochem J* 1974; 139: 359-368.
- 205-WERB Z, REYNOLDS JJ Stimulation by endocytosis of the secretion of collagenase and neutral proteinase from rabbit synovial fibroblasts *J Exp Med* 1974; 140: 1481-1497.
- 206-WERB Z, MAINARD CL, VATER CA, HARRIS EDJr. Endogenous activation of latent collagenase by rheumatoid synovial cells. *N Engl J Med* 1977; 296: 1017-1023.
- 207-WHITE DJG, PLUMB AM, PAWELEC G, BRONS G Cyclosporin A: an immunosuppressive agent preferentially active against proliferating T cells. *Transplantation* 1979; 27: 55-58.
- 208-WILLERSHAUSEN-ZÖNNCHEN B, LEMMEN C, SCHUMACHER U Influence of cyclosporine A on growth and extracellular matrix synthesis of human fibroblasts. *J Cell Physiol* 1992; 152: 397-402.

- 209-WOOLEY DE, ROBERTS DR, EVANSON JM Small molecular-weight β_1 serum protein which specifically inhibits human collagenases. *Nature* 1976; 261: 325-327.
- 210-WITKOP CM Heterogeneity in gingival fibromatosis. *Birth Defects* 1971; 7: 210-221.
- 211-WYNE SE, ALDRED MJ, BARTOLD PM Hereditary gingival fibromatosis associated with hearing loss and supernumerary teeth: a new syndrome. *J Periodontol* 1995; 66: 75-79.
- 212-WYSOCKI GP, GRETZINGER HA, LAUPACIS A et al. Fibrous hyperplasia of the gingiva: a side effect of cyclosporin A therapy. *Oral Surg. Oral Med Oral Pathol* 1983; 55: 274-278.
- 213-YAMADA KM, OLDEN K Fibronectins - adhesive glycoproteins of the cell surface and blood. *Nature* 1978; 275: 161-179.
- 214-YAMASAKI A, ROSE GG, PINERO GJ, MAHAN CJ Ultrastructure of fibroblasts in cyclosporin A-induced gingival hyperplasia. *J Oral Pathol* 1987; 16: 129-134.
- 215-YATSKOFF RW, RUSH DH, JEFFEREY JR Effect of sample preparation on concentration of cyclosporine A measured in plasma. *Clin Chem* 1984; 30: 1812.

- 216-YEE GC, KENHEDY MS, STORB R, THOMAS D Effect of hepatic dysfunction on oral cyclosporine pharmacokinetics in marrow transplant patients. *Blood* 1984; 64: 1277-1279.
- 217-ZEBROWSKI EJ, SINGER DL, BRUNKA JR Cyclosporin-A, Nifedipine and Phenytoin: comparative effects on gingival fibroblasts metabolism. *J Dent Res* 1986; 65: 331.
- 218-ZEBROWSKI EJ, RAMAMURTHY NS, SINGER DL, BRUNKA JR Collagenase activity of cyclosporin, nifedipine and phenytoin treated fibroblasts. *J Dent Res* 1988; 67: 331.