

Lays Martin Sobral
Cirurgiã-Dentista

**Análise dos Efeitos e dos Mecanismos de Ação do Fator
de Crescimento Transformante- β 1, Interferon γ e
Ciclosporina A na Transdiferenciação dos
Fibroblastos Gengivais em Miofibroblastos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Mestre em
Estomatopatologia na área de Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Piracicaba
2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

So12a Sobral, Lays Martin.
Análise dos efeitos e dos mecanismos de ação do fator de crescimento transformante- β 1, interferon γ e ciclosporina A na transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos. / Lays Martin Sobral. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.

Orientador: Ricardo Della Coletta.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Fator de crescimento transformante-beta1. 2. Interferon-gama. 3. Fibroblastos. 4. Fibromatose gengival. I. Della Coletta, Ricardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Effects of transforming growth factor-beta 1, interferon gamma and cyclosporin A on transdifferentiation of gingival fibroblasts in myofibroblasts

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Transforming growth factor beta. 2. Interferon-gamma. 3. Fibroblasts. 4. Gingival fibromatosis

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Ricardo Della Coletta, Paulo Tambasco de Oliveira, Edgard Graner

Data da Defesa: 23-02-2007

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 23 de Fevereiro de 2007, considerou a candidata LAYS MARTIN SOBRAL aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Ricardo Della Coletta".

PROF. DR. RICARDO DELLA COLETTA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Paulo Tambasco de Oliveira".

PROF. DR. PAULO TAMBASCO DE OLIVEIRA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Edgard Graner".

PROF. DR. EDGARD GRANER

Dedicatória

A Deus, por sempre guiar meus passos e iluminar meus caminhos.

*Aos meus pais, **Paulo e Ilda**, por me apoiarem em todas as minhas escolhas e estarem presentes em todos os momentos, verdadeiros exemplos de amor incondicional e a quem eu devo toda a minha vida.*

*Aos meus irmãos **Luciano** e sua esposa **Lílian e Leonardo**, pelo incentivo constante e que mesmo à distância sempre torceram por mim.*

*Ao **Jonathan**, que apareceu no momento certo e, com certeza, tornou essa jornada mais alegre e mais fácil de ser enfrentada...*

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, que nunca poupou esforços para me ajudar durante meu aprendizado e na realização deste estudo.*

Registro aqui minha admiração pelo seu exemplo de trabalho e dedicação.

Agradecimentos

*À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**.*

*Ao **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.*

*Ao **Prof. Dr. Edgard Graner**, pelas valiosas sugestões dadas durante o desenvolvimento deste estudo e pelos conhecimentos transmitidos com tanta dedicação.*

*Aos **Profs. Drs. Oslei Paes de Almeida, Márcio Ajudarte Lopes, Jacks Jorge Júnior, Pablo Agustin Vargas e Oswaldo Di Hipólito Júnior**, professores da área de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, por todos os ensinamentos transmitidos.*

*Agradecimento especial à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, que tornou possível o desenvolvimento deste estudo através da concessão da bolsa de mestrado (Processo n° 05/01003-7) e do Apoio Financeiro ao Projeto (Processo n° 04/10029-7).*

*As minhas grandes amigas e companheiras, **Michele Kellermann, Sandrine e Rebeca**, pela amizade verdadeira, respeito e cumplicidade que foram construídos durante estes anos de convivência.*

As grandes amigas Michelle Agostini e Ana Lúcia, pela palavra amiga no momento certo e pela incessante ajuda.

Aos grandes amigos Marco Antônio e Guillermo, pela ajuda em todos os momentos que precisei.

Aos amigos e colegas da Patologia Andréia, Lucielma, Patrícia, LÍlian, Érica, Kênia, Marcelo, Fernanda, Carolina, Adriele, Sabrina, Luís, Mário, Alan, Dawton, Eduardo, Ademar, Jorge, Ana Carolina, Fábio Ito, Fábio Ornellas e Francisco Amanajás, pela agradável convivência durante estes dois anos.

À Dra. Karina Gottardelo Zecchin, pelo auxílio gentil durante os experimentos de citometria de fluxo, realizados no Laboratório de Bioenergética da Faculdade de Medicina de Campinas –UNICAMP.

À Ana Cristina do Amaral Godoy, técnica do laboratório de Patologia, pela realização das reações imunohistoquímicas deste trabalho e, principalmente, por todo o carinho dedicado.

Aos demais funcionários do laboratório de Patologia, Adriano Luís Martins, João Carlos Gomes da Silva Júnior, Valéria Alessandra Prado Defavari Franco, Rosa Maria Fornasier, as estagiárias Hellen e Melise e a funcionária do Orocentro Sra. Aparecida Conceição Campion, pelo auxílio, colaboração e generosidade.

*Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco; a medida que vamos
adquirindo conhecimento, instalá-se a dúvida.*

Johan Wolfgang von Goethe

Miofibroblastos são células especializadas que exercem funções importantes em processos fibróticos através da síntese elevada de macromoléculas da matriz extracelular, proteases e citocinas. O exato mecanismo do surgimento (transdiferenciação) dos miofibroblastos permanece desconhecido, porém inúmeros estudos sugerem que o fator de crescimento transformante- β 1 (TGF- β 1) exerça um papel importante neste processo via ativação do fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF). Em oposição aos efeitos de TGF- β 1, algumas citocinas inflamatórias, incluindo interferon γ (IFN γ), parecem inibir a transdiferenciação dos miofibroblastos. O uso da droga imunossupressora ciclosporina A (CsA) é freqüentemente associada a inúmeros efeitos colaterais, sendo o aumento gengival fibrótico o de maior interesse para a área odontológica. Linhagens celulares de fibroblastos de gengiva normal tratadas com CsA expressam níveis elevados de TGF- β 1 e colágeno, que são intrínsecos do fenótipo miofibroblástico. Os objetivos deste estudo foram compreender a participação de TGF- β 1 e IFN γ na transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos e entender os mecanismos de ação destes fatores neste processo. Adicionalmente, nós verificamos a presença de miofibroblastos em aumentos gengivais induzidos por CsA. Nossos resultados demonstraram, através de 4 diferentes ensaios: transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), western blot, imunofluorescência e citometria de fluxo, que TGF- β 1 induz e IFN γ bloqueia a transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos metabolicamente ativos em uma maneira dependente da dose e tempo. Nas células onde a expressão de CTGF foi significativamente reduzida por seqüências específicas de RNA de interferência, TGF- β 1 não foi capaz de promover a transdiferenciação dos miofibroblastos, revelando que TGF- β 1 é dependente da ativação de CTGF para induzir a transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em

miofibroblastos. IFN γ bloqueou a transdiferenciação dos miofibroblastos por estimular a expressão de Smad 7, uma proteína que regula negativamente a atividade de TGF- β 1. Interessantemente, miofibroblastos não foram associados aos aumentos gengivais induzidos por CsA, como revelado pelos modelos *in vivo* de injeções diárias de CsA em ratos Wistar e *in vitro* de tratamento de fibroblastos gengivais com CsA. Embora CsA tenha induzido a expressão de TGF- β 1, não demonstrou nenhum efeito na modulação dos níveis de CTGF. Nossos resultados demonstram que a indução da transdiferenciação dos miofibroblastos por TGF- β 1 é dependente da estimulação de CTGF. Adicionalmente, este estudo sugere que IFN γ pode ser clinicamente efetivo no tratamento de alterações fibróticas associadas à presença de miofibroblastos, pois atenua a excessiva produção de colágeno tipo I por estas células.

Palavras-chaves: TGF- β 1, Interferon γ , Ciclosporina A, Fiboblastos gengivais, Miofibroblastos, Aumentos gengivais, Fibromatose gengival hereditária.

Myfibroblasts are the main cellular type involved in extracellular matrix deposition in fibrotic diseases. Relatively little is known about the underlying mechanisms that regulate myfibroblast emergence (transdifferentiation), however the regulatory cytokine transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) has been traditionally considered an inducer of the myfibroblastic phenotype via activation of connective tissue growth factor (CTGF)-dependent pathway. Some inflammatory cytokines, particularly interferon γ (IFN γ), show opposite effects to TGF- β 1, inhibiting myfibroblast transdifferentiation. Cyclosporin A (CsA) is a widely used immunosuppressant drug that causes significant side effects such as gingival overgrowth. Normal gingival fibroblast cell lines treated with CsA express high levels of TGF- β 1 and collagen, which are intrinsic of myfibroblasts. In the present study we examined whether TGF- β 1 and IFN γ can modulate transdifferentiation of gingival fibroblasts into myfibroblasts, and the biologic mechanisms behind those factors in this process. Additionally, we have analyzed the presence of myfibroblasts in CsA-induced gingival overgrowth. Our results demonstrated throughout a modality of experiments that included reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), western blot, immunofluorescence and flow cytometry analysis, that TGF- β 1 induces and IFN γ blocks fibroblast-myfibroblast transdifferentiation in a dose- and time-dependent manner. In fibroblasts with CTGF levels know-down by specific small interference RNA, TGF- β 1 effect on transdifferentiation was significantly reduced, revealing that CTGF plays a crucial role in mediating TGF- β 1 myfibroblast transdifferentiation. IFN γ blocked myfibroblast transdifferentiation by stimulating Smad 7 levels, a protein that negatively regulates TGF- β 1 signaling. Interestingly, myfibroblasts were not found in CsA-induced gingival overgrowth, as revealed by the *in vivo* model of daily injections of CsA in Wistar rats and by the *in vitro* model of gingival fibroblast cultures treated with CsA. Although CsA treatment stimulated TGF- β 1 expression

by NG fibroblasts, it lacked to induce CTGF levels. Our results demonstrate that TGF- β 1 induction of transdifferentiation of gingival fibroblasts to myofibroblasts occurs via a CTGF dependent pathway. Additionally, this study suggests that IFN γ may be clinically effective in the treatment of fibrotic diseases associate with myofibroblast.

Keywords: TGF- β 1, Interferon γ , Cyclosporin A, Gingival fibroblasts, Myofibroblasts, Gingival overgrowth, Hereditary gingival fibromatosis.

1. Introdução	01
2. Revisão da Literatura	05
2.1. Miofibroblastos, TGF- β 1 e IFN γ	05
2.2. Aumento Gengival Induzido por CsA	11
3. Proposição	21
4. Materiais e Métodos	23
4.1. Aprovações dos Comitês de Ética	23
4.2. Culturas Celulares Humanas e Tratamentos	23
4.3. Modelo Animal de Indução de Aumento Gengival	24
4.4. Estabelecimento das Culturas Celulares de Fibroblastos Derivadas de Aumentos Gengivais Induzidos por CsA em Ratos	24
4.5. Imunohistoquímica	25
4.6. Análise de Western Blot	25
4.7. Análise Semi-Quantitativa de Transcriptase Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)	26
4.8. Imunofluorescência	29
4.9. Citometria de Fluxo	29
4.10. ELISA para Colágeno Tipo I	30
4.11. Técnica de RNA de Interferência (siRNA-small interferenceRNA)	30
4.12. Análise Densitométrica	31

4.13. Análise Estatística	32
5. Resultados	33
5.1. TGF- β 1 Induz a Transdiferenciação de Miofibroblastos Metabolicamente Ativos em Culturas Celulares de GN	33
5.2. TGF- β 1 Induz a Transdiferenciação dos Miofibroblastos em uma Via Dependente de CTGF	35
5.3. IFN γ Inibe Simultaneamente a Expressão de α -SMA e Colágeno Tipo I	36
5.4. IFN γ Inibe a Transdiferenciação dos Miofibroblastos Induzida por TGF- β 1	36
5.5. IFN γ Bloqueia a Transdiferenciação dos Miofibroblastos Via Estimulação de Smad 7	37
5.6. IFN γ Inibe a Expressão de α -SMA e Colágeno Tipo I em Linhagens Celulares de Miofibroblastos Via Estimulação de Smad 7	38
5.7. Ausência de Miofibroblastos nos Aumentos Gengivais Induzidos por CsA em Ratos	39
5.8. Efeito de CsA na Transdiferenciação dos Miofibroblastos em Culturas de Fibroblastos Gengivais	41
6. Discussão	67
7. Conclusões	77
Referências	79
Anexos	97

1. Introdução

Miofibroblastos são células que apresentam um fenótipo híbrido, contendo características de fibroblastos e de células de musculatura lisa (Badid *et al.*, 2000). Estas células são caracterizadas pela expressão da isoforma α da actina de músculo liso (α -SMA) e estão presentes de forma transiente em processos de reparo, exercendo papel importante na contração da ferida. Porém, quando persistentes são responsáveis pela formação de tecidos fibrosos, como no caso dos quelóides e das fibroses renais, pulmonares e pancreáticas (Tomasek *et al.*, 2002). Miofibroblastos são caracterizados por uma produção elevada de citocinas, incluindo o fator de crescimento transformante- β 1 (TGF- β 1) e matriz extracelular (MEC), particularmente colágeno, e uma síntese reduzida de metaloproteinases de matriz (MMPs), que são as principais enzimas responsáveis pela degradação da MEC (Gabbiani, 2003). Embora os mecanismos que induzam o aparecimento dos miofibroblastos sejam parcialmente desconhecidos, estudos recentes demonstraram uma origem a partir da diferenciação de células indiferenciadas ou através da transdiferenciação de fibroblastos (Tomasek *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2006; Bitu *et al.*, 2006). Em ambas as situações, TGF- β 1 parece ter um papel importante via ativação do fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) (Garrett *et al.*, 2004; Grotendorst *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). Em oposição aos efeitos de TGF- β 1, algumas citocinas inflamatórias demonstraram um efeito inibitório na transdiferenciação dos miofibroblastos, entre elas podemos citar o interferon gama (IFN γ). TGF- β 1 é uma citocina multifuncional envolvida em vários eventos celulares como crescimento, diferenciação, mobilidade e apoptose (Huang & Lee, 2003). A via de sinalização de TGF- β 1 é iniciada a partir da ligação com seus receptores transmembrânicos que ativam os mensageiros citoplasmáticos de 2 principais cascatas: cascata Smad (a mais importante e que será revisada neste trabalho) e cascata MAPK (Derynck & Zhang, 2003; Cowell *et al.*, 2006). Após ligação de TGF- β 1 aos receptores, Smad 2 e/ou Smad 3 são fosforilados e formam um complexo com Smad 4, sendo então translocados para o núcleo, onde irão agir como fatores de transcrição ou associarem a outras

proteínas nucleares (Massague & Wotton, 2000; Massague & Gomis, 2006). Smad 6 e Smad 7 possuem uma atividade inibitória nesta cascata, impedindo a fosforilação de Smad 2 e Smad 3 (Derynck & Zhang, 2003). Alguns estudos sugeriram que IFN γ estimula a produção de Smad 7 e conseqüentemente inibe os efeitos de TGF- β 1 através do bloqueio de sua cascata de ativação (Ulloa *et al.*, 1999; Wen *et al.*, 2004).

Aumento gengival é um termo estritamente clínico utilizado para descrever um aumento volumétrico do tecido gengival, que pode inicialmente envolver as papilas interdentais e, posteriormente, evoluir para um recobrimento de todas as faces da coroa dental (Trackman & Katarci, 2004). O aumento gengival pode estar associado a vários fatores etiológicos como acúmulo de placa bacteriana com conseqüente inflamação gengival, ser de caráter hereditário como na fibromatose gengival hereditária (FGH) ou ser resultado do uso de medicamentos, incluindo bloqueadores de canais de cálcio, fenitoína e ciclosporina A (CsA) (Dongari-Bagtzoglou, 2004). CsA é um medicamento imunossupressor utilizado principalmente na prevenção da rejeição de órgãos transplantados, porém ultimamente tem sido utilizado no tratamento de doenças auto-imunes como psoríase e artrite reumatóide (Kahan, 1999; Kovarik & Burtin, 2003). O uso da CsA está relacionado ao desenvolvimento de inúmeros efeitos colaterais, sendo o aumento gengival o de maior interesse para área odontológica (Cotrim *et al.*, 2003). O aumento gengival induzido por CsA tem como principal característica o acúmulo excessivo de tecido conjuntivo fibroso, o qual é resultado de alterações em 2 principais eventos: produção elevada de colágeno e expressão reduzida de MMPs (Cotrim *et al.*, 2002).

Os objetivos deste estudo foram compreender os efeitos de TGF- β 1 e IFN γ na transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos e determinar os mecanismos de ação destes fatores neste processo. Adicionalmente, como o aumento gengival induzido por CsA é um processo fibrótico e culturas celulares de gengiva normal (GN) tratadas com CsA apresentam um fenótipo caracterizado por uma produção excessiva de MEC e TGF- β 1, o que é intrínseco de miofibroblastos,

nós analisamos a presença de miofibroblastos em aumentos gengivais induzidos por CsA em ratos e em culturas de fibroblastos gengivais tratadas com CsA.

2. Revisão da Literatura

2.1. Miofibroblastos, TGF- β 1 e IFN γ

Miofibroblastos são células mesenquimais que exibem um fenótipo híbrido com características de fibroblastos e de células musculares lisas (Gabbiani, 1992; Badid *et al.*, 2000). Estas células foram primeiramente observadas em tecidos de granulação durante os processos de cicatrização e, posteriormente, em numerosos processos patológicos, incluindo quelóides e fibromatoses (Hinz & Gabbiani, 2003; Desmouliere *et al.*, 2005).

Os miofibroblastos se formam a partir da diferenciação de células indiferenciadas ou da transdiferenciação de fibroblastos, processo que se inicia com a aquisição de fibras do estresse compostas por actina citoplasmática e a produção de fibronectina celular, uma variante da fibronectina que está presente durante o desenvolvimento de muitos órgãos e, com raras exceções, não é encontrada em tecidos adultos (Desmouliere *et al.*, 2003). Estas células quando ativadas sintetizam níveis elevados de proteínas da MEC, particularmente colágeno, e reduzidos níveis de MMPs. Morfologicamente, os miofibroblastos são caracterizados pela presença de um intenso aparato contrátil, contendo um empacotamento de microfilamentos de actina, principalmente α -SMA, associado a proteínas como miosina e fibras do estresse (Serini & Gabbiani, 1999; Desmouliere *et al.*, 2005). Durante o processo normal de reparo, os miofibroblastos são transientes, exercendo funções essenciais na contração da ferida e na restauração do tecido conjuntivo através da produção de MEC e de fatores de crescimento. Quando o tecido é restaurado, acredita-se que estas células entram em um processo de apoptose. Contudo, se estas células persistem, se tornam responsáveis pela excessiva produção de colágeno, levando a formação de fibroses (Tomasek *et al.*, 2002).

Inúmeros estudos demonstraram a presença de células com características de miofibroblastos em tecidos normais especializados e em uma variedade de situações patológicas, como na Doença de Dupuytren, na pancreatite fibrosa induzida por CsA e nas fibroses pulmonar, renal e hepática (Vaquero *et al.*, 1999;

Yang & Lyu, 2001; Phan, 2002; Tomasek *et al.*, 2002; Qi *et al.*, 2005; Willis *et al.*, 2006). A doença de Dupuytren é uma doença miofibroblástica proliferativa caracterizada pelo espessamento das bandas fibrosas da superfície palmar das mãos e dedos, onde os efeitos proliferativos e fibrinogênicos de TGF- β 1 se apresentam exacerbados (Tomasek *et al.*, 2002). A progressão da doença renal crônica é considerada um processo irreversível, que eventualmente, evolui para um estágio final de insuficiência renal, caracterizada pela intensa proliferação de miofibroblastos e o acúmulo de tecido conjuntivo fibroso (Yang & Liu, 2001; Qi *et al.*, 2005). Os miofibroblastos também exercem um papel fundamental na patogênese da fibrose pulmonar idiopática e estão associados com a progressão da doença e um prognóstico desfavorável. Acredita-se que os miofibroblastos sejam responsáveis pela deposição de MEC, remodelação estrutural e destruição das unidades alveolocapilares durante e depois da injúria pulmonar (Willis *et al.*, 2006). Adicionalmente, a persistência dos miofibroblastos pode anunciar a progressão da doença, enquanto seu desaparecimento pode ser indicativo de cura (Phan, 2002).

Os mecanismos que desencadeiam a transdiferenciação dos miofibroblastos permanecem desconhecidos, porém vários estudos demonstraram um papel importante para TGF- β 1 neste processo (Fan *et al.*, 1999; Petrov *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2003; Malmström *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006). Fan *et al.* (1999) demonstraram que TGF- β 1 é capaz de promover a transdiferenciação de linhagens celulares de células epiteliais tubulares de ratos em miofibroblastos. Estes autores demonstraram que o tratamento com TGF- β 1 é acompanhado pela expressão do marcador específico de miofibroblastos (α -SMA) e uma diminuição na expressão do marcador epitelial E-caderina. Este estudo também demonstrou que é necessária uma concentração mínima de TGF- β 1 para desencadear o processo de transdiferenciação das células epiteliais em miofibroblastos. Recentemente, Smith *et al.* (2006) demonstraram que TGF- β 1 induz a transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos e sugeriram que este evento é dependente das vias de sinalização celular RhoA-ROCK e proteína

quinase c-Jun N-terminal. Similarmente, o tratamento dos fibroblastos pulmonares com TGF- β 1 induziu a transdiferenciação em miofibroblastos, como revelado pela expressão de α -SMA, alterações no fenótipo das células e alterações funcionais caracterizadas por mudanças no catabolismo de colágeno (Evans *et al.*, 2003). Desmouliere *et al.* (1993) demonstraram em um estudo realizado *in vivo* com ratos Wistar submetidos ao tratamento local com TGF- β 1 por 7 dias, que o tecido de granulação apresentava um número significativamente maior de miofibroblastos que o tecido de granulação de animais controle. Estes autores também observaram *in vitro* que fibroblastos humanos tratados com TGF- β 1 se transdiferenciavam em miofibroblastos.

TGF- β 1 é uma citocina multifuncional pertencente à família TGF- β de polipeptídeos. Esta família é formada por, pelo menos, 26 membros em mamíferos, incluindo 3 isoformas de TGF- β (β 1, β 2 e β 3), 4 isoformas de activin e 20 isoformas de proteínas morfogênicas do osso (BMPs) (Massague, 1998; Chen *et al.*, 2004). TGF- β 1 foi primeiramente identificado através da purificação de proteínas da placenta humana em 1983 por Frolik e colaboradores. A denominação TGF é devido à habilidade deste fator permitir que células normais cresçam em uma condição independente de ancoragem (crescimento em soft ágar), uma característica exclusiva de células malignas (células transformadas), e por causar transformações fenotípicas em fibroblastos (Roberts *et al.*, 1981; Tucker *et al.*, 1983). Esta citocina regula vários eventos celulares como proliferação, diferenciação, adesão, mobilidade, apoptose e resposta imunológica, realizando também um papel muito importante nos processos de reparo e fibrose, estimulando a produção de MEC por fibroblastos (O'Kane & Ferguson, 1997; Kucich *et al.*, 2001; Govinden & Bhoola, 2003).

As ações de TGF- β 1 são mediadas por interações heteroméricas com receptores serina/treonina quinase tipo I e II (Goumans *et al.*, 2002). O início da sinalização necessita da ligação de TGF- β 1 com os receptores transmembrânicos. Esta interação ligante-receptor ativa os mensageiros citoplasmáticos desta cascata, incluindo as proteínas Smads. Existem 8 proteínas Smads descritas em

vertebrados (Smad 1-8). Smad 2 e Smad 3 são ativados por TGF- β 1, Smad 4 atua como cofator, enquanto Smad 6 e Smad 7 possuem uma atividade inibitória na cascata de ativação de TGF- β (Derynck & Zhang, 2003). Especificamente, a ativação de TGF- β 1 é propagada pela fosforilação de Smad 2 ou Smad 3, que então se associam a Smad 4 e são translocadas para o interior do núcleo. No núcleo estes complexos atuam diretamente como fatores de transcrição, iniciando a ativação de genes específicos, ou indiretamente, associando-se a proteínas de ligação do DNA (Moustakas *et al.*, 2001; Mehra & Wrana, 2002; Massague & Gomis, 2006). Alternativamente, TGF- β 1 pode ativar a cascata MAPK, com a participação de ERK, JNK e p38. Estudos utilizando células deficientes em Smad 4 ou Smads negativas (Smad 6 e Smad 7) suportam a possibilidade de que a ativação da via MAPK seja independente de Smad (Derynck & Zhang, 2003).

Evidências recentes demonstraram que os efeitos de TGF- β 1 na produção de MEC e na transdiferenciação de miofibroblastos são mediados pela estimulação de CTGF (Grotendorst *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004). Este fator de crescimento juntamente com Cyr61 e Nov são membros originais de uma família de proteínas denominada CCN (CTGF, Cyr61 e Nov) com participação em vários processos biológicos, incluindo reparo tecidual através da estimulação da proliferação de fibroblastos e síntese de MEC (Grotendorst & Duncan, 2005; Dosanjh, 2006). Níveis elevados de CTGF são encontrados em numerosas desordens fibrosas como fibrose renal, pulmonar e aterosclerose, onde estes níveis estão relacionados com uma elevada síntese de colágeno (Garret *et al.*, 2004). Um estudo demonstrou que a proliferação de fibroblastos, a síntese de colágeno e a transdiferenciação de miofibroblastos estimulada por TGF- β 1 são inibidas pelo bloqueio de CTGF, demonstrando que CTGF age como uma citocina secundária aos efeitos biológicos de TGF- β 1 sobre os fibroblastos (Grotendorst & Duncan, 2005). Garret *et al.* (2004) realizaram um estudo envolvendo culturas celulares de fibroblastos de córnea humana e observaram que após o tratamento com TGF- β 1 e oligonucleotídeos antisense contra CTGF, a transdiferenciação dos miofibroblastos foi significativamente inibida. Zhang *et al.* (2004) em um estudo,

utilizando oligonucleotídeos antisense contra CTGF, mas neste caso utilizando células epiteliais tubulares proximais, observaram uma diminuição na produção e expressão de α -SMA quando estimuladas com TGF- β 1, sugerindo que a transdiferenciação via TGF- β 1 é extremamente dependente da presença e função de CTGF. O exato mecanismo que controla a expressão gênica de CTGF em fibroblastos permanece desconhecido, porém alguns estudos demonstraram que a indução de CTGF por TGF- β 1 envolve um sítio de ligação funcional do complexo Smad 3/Smad 4 na região promotora de CTGF localizada entre os nucleotídeos 166 e 173 (Holmes *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002).

Métodos de bloqueio da síntese de TGF- β 1 vêm sendo testados como uma forma de tratamento de doenças causadas por fibroses intersticiais. O principal objetivo deste método é bloquear os efeitos de TGF- β 1 na transdiferenciação de miofibroblastos e a conseqüente progressão da fibrose (para revisão ver Gressner *et al.*, 2002). Embora estes estudos tenham demonstrado resultados satisfatórios no tratamento de fibroses hepáticas em animais, o número de efeitos colaterais limita a aplicação clínica em humanos.

Interferons (IFN) foram originalmente descobertos como agentes que interferiam com a replicação viral. Inicialmente foram classificados de acordo com o tipo celular que os secretavam, porém hoje são classificados em Tipo 1 e Tipo 2, de acordo com o seu receptor específico. IFN γ é o único membro pertencente ao grupo 2, não tendo relação estrutural aos IFNs do Tipo 1. Inicialmente, acreditava-se que o IFN γ fosse produzido exclusivamente pelos linfócitos T CD4⁺ Th1, linfócitos T CD8⁺ e células “natural killers” (NK), porém atualmente existem evidências de que ele pode ser secretado por linfócitos B e células apresentadoras de antígeno (monócitos/macrófagos e células dendríticas) (Schroder *et al.*, 2004). IFN γ foi inicialmente denominado de “fator ativador de macrófagos”, pois estimula diretamente os mecanismos antimicrobianos e antitumorais destas células, bem como regula as vias de processamento e apresentação de antígenos pelos macrófagos. A produção de IFN γ é controlada por citocinas secretadas pelas células apresentadoras de antígeno, principalmente interleucina (IL) 12 e IL-18. O

reconhecimento dos patógenos pelos macrófagos induz a produção de IL-12, funcionando como um agente quimiotático para linfócitos T e células NK que migram para o local inflamado e sintetizam níveis elevados de IFN γ (Schroder *et al.*, 2004). Contudo, as atividades biológicas de IFN γ não se limitam à modulação da resposta imune. IFN γ exerce funções antiproliferativas e quimiotáticas em vários tipos celulares, suprime a síntese de colágeno por fibroblastos humanos e inibe a ativação miofibroblástica de células hepáticas (Giannoupoulou *et al.*, 2005). Culturas celulares de fibroblastos intersticiais renais demonstraram uma intensa inibição da expressão de α -SMA e fibronectina quando tratadas com IFN γ (Strutz *et al.*, 2000). Giannoupoulou *et al.* (2005) demonstraram que IFN γ inibe a resposta fibrogênica de células epiteliais tubulares, evidenciada pela diminuição na expressão de α -SMA, fibronectina e do inibidor do ativador de plasminogênio 1 estimulada por TGF- β 1. Tanaka *et al.* (2003), utilizando fibroblastos humanos, observaram que quando estas células foram tratadas concomitantemente com TGF- β 1 e IFN γ apresentavam uma inibição considerável na expressão e produção de α -SMA. Hasegawa *et al.* (2002) demonstraram que fibroblastos dérmicos normais tratados com 10 ng/ml de TGF- β 1 transdiferenciavam em miofibroblastos. Contudo, este fenótipo foi inibido com o tratamento concomitante com IFN γ . Alguns estudos *in vivo* confirmaram os efeitos antifibróticos de IFN γ em modelos animais e em pacientes com esclerose sistêmica ou fibrose hepática (Baroni *et al.*, 1996; Cornelissen *et al.*, 2000; Desmouliere *et al.*, 2003; Carulli *et al.*, 2005). Baroni *et al.* (1996) utilizaram um modelo animal de desenvolvimento de fibrose hepática através do tratamento com dimetilnitrosamina e observaram que estes animais ao serem submetidos ao tratamento concomitante com IFN γ apresentavam uma redução na proliferação e ativação dos miofibroblastos, que foram acompanhadas por uma diminuição na deposição de MEC e na expressão de mRNAs para colágeno, fibronectina e laminina. A via de inibição de IFN γ sobre a atividade de TGF- β 1 e seus efeitos fibrogênicos permanecem parcialmente conhecidos. Estudos recentes vêm sugerindo que IFN γ é capaz de induzir a

expressão de Smad 7 e inibir a cascata de ativação de TGF- β 1. Ulloa *et al.* (1999) demonstraram uma comunicação entre as vias TGF- β /Smad e IFN γ /STAT. Estes autores demonstraram que IFN γ aumenta rapidamente a expressão de Smad 7 através da via Jak/Stat, causando uma inibição na fosforilação de Smad 3 mediada por TGF- β 1.

2.2. Aumento Gengival Induzido por CsA

CsA é um undecapeptídeo cíclico, neutro, lipofílico e com intensa atividade imunossupressora, que foi originalmente purificado dos extratos dos fungos *Topocladium inflatum* e *Cylindrocarpon lucidum* (Borel *et al.*, 1976). CsA também apresenta uma moderada atividade antifúngica e antibacteriana. Como medicamento profilático para a prevenção da rejeição de transplantes alogênicos de rim, fígado e coração, CsA foi aprovada pela FDA (Food and Drug Administration, USA) no começo dos anos 80 para uso isolado ou em combinação com esteróides, como citado na recente revisão de Rezzani (2006). Nos últimos anos CsA também vem sendo usada com resultados satisfatórios no tratamento de doenças de caráter auto-imune, incluindo psoríase, artrite reumatóide, doença de Crohn, entre outras (Gerards *et al.*, 2003; McDonald *et al.*, 2005; Pedraz *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2006).

CsA pode ser administrada por via oral, intramuscular ou endovenosa. O fármaco é comercializado para administração oral nas formas de cápsula (com 25, 50 e 100 mg/cápsula) ou solução (100 mg/ml), e para administração injetável (concentrações de 50 mg/ml, 100 mg/ml e 250 mg/5ml) com nomes comerciais de Sandimmun Neoral e Sandimmun pela Novartis. Hoje no Brasil já se encontra o seu correspondente genérico com capacidade de indução de imunossupressão similar à versão clássica (Ponticelli, 2004). Após administração oral, a principal via de administração da droga, CsA é absorvida principalmente no intestino delgado com uma forte dependência de sais biliares, devido a sua característica lipofílica, e uma marcada variação inter-individual. O pico da concentração plasmática ocorre 3-4 horas após o uso da droga, com a vida média do fármaco entre 17-40 horas.

Na corrente sangüínea, CsA está principalmente conjugada às células (hemácias) e lipoproteínas, com apenas 5% livre no plasma (Ho *et al.*, 1996). A metabolização da CsA acontece no fígado através das enzimas citocromos P-450-IIIa e P-450 hPCN₃ (Maurer, 1985). Existem 14 produtos derivados do metabolismo da CsA, embora apenas 3 são metabólitos ativos em humanos. A grande maioria dos metabólitos é excretada via fezes, com apenas 10% sendo excretado na urina. Para garantia de imunossupressão é recomendado que os níveis séricos de CsA em pacientes transplantados variem entre 150 e 250 ng/ml nos primeiros 90 dias do início do tratamento, com uma redução para 100-150 ng/ml nos períodos posteriores.

O mecanismo de ação da CsA consiste em inibir reversivelmente a resposta imunológica mediada por linfócitos T CD4⁺, bloqueando a síntese de IL-2 bem como a produção de IFN γ necessária para a ativação de macrófagos e monócitos. Embora em pequena intensidade, CsA é capaz de suprimir a resposta imunológica humoral por afetar a proliferação e maturação de células B (Ho *et al.*, 1996). A inibição de IL-2 limita a amplificação clonal e a ativação funcional de linfócitos T auxiliares (CD4⁺) e citotóxicos (CD8⁺), além de interferir na produção de outras citocinas como IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, fator necrotizante de tumor (TNF) e fator estimulador de colônias de macrófagos (Ho *et al.*, 1996). A atividade inibitória de CsA é dependente da associação com o receptor citoplasmático ciclofilina, uma proteína da família das imunofilinas (Wang & Heitman, 2005). A ligação CsA-ciclofilina forma um complexo ternário com calmodulina (uma serina/treonina fosfatase dependente de cálcio), bloqueando a capacidade de calmodulina de regular a expressão gênica de citocinas, em particular do fator nuclear (fator de transcrição) de células T (NF/AT) (Kahan, 1999). Em oposto ao efeito inibidor que CsA exerce sobre a produção de IL-2, estudos recentes demonstram um estímulo na produção de TGF- β 1, que pode estar envolvido com o desenvolvimento dos principais efeitos colaterais associados ao uso do medicamento. Por exemplo, TGF- β 1 é considerado uma citocina chave na patogênese da nefropatia alográfica crônica, a principal causa de insucesso tardio de transplantes renais (Campistol *et*

al., 2001). Além disso, foi demonstrado que CsA eleva os níveis de produção de TGF- β 1, favorecendo a indução e promoção de tumores malignos (Hojo *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2002).

O uso de CsA está associado com um grande número de efeitos colaterais como nefro, hepato e neurotoxicidade, hipertensão, presença de cálculos biliares, diabetes, alteração no metabolismo ósseo e hirsutismo, além de infecções oportunistas associadas indiretamente a droga. Outros menos comuns efeitos indesejáveis associados com CsA são: indução de neoplasias, incluindo linfomas, sarcomas de Kaposi e carcinomas espinocelulares, distúrbios visuais, anemias e depressão. Porém, o efeito indesejável de maior interesse para a área odontológica é o aumento gengival (Ciavarella *et al.*, 2007).

O aumento gengival induzido por CsA é clinicamente caracterizado por um crescimento lento, nodular e indolor, envolvendo primariamente as papilas interdentais e as margens gengivais. A região anterior e vestibular dos dentes são as áreas mais afetadas (Seymour & Jacobs, 1992). Com a continuidade do uso da droga pelo paciente, o aumento gengival progride podendo recobrir consideráveis porções da coroa dental, interferido na oclusão, fala e deglutição, além de ocasionar graves problemas estéticos (Seymour & Jacobs, 1992; Seymour, 2006). Um estudo analisando 194 pacientes transplantados que faziam uso de CsA demonstrou que os caninos são os dentes mais afetados (Thomason *et al.*, 1996a). A presença de dentes parece ser necessária para a indução do aumento gengival, visto que indivíduos desdentados não apresentam crescimento tecidual. Contudo, um recente estudo utilizando o modelo animal para a indução de aumento gengival revelou em regiões edéntulas um aumento na espessura da mucosa que recobre os ossos alveolares após o tratamento com CsA (Chen *et al.*, 2005). O aumento gengival ocorre em média 3 meses após o início do tratamento com a droga, embora existam casos que documentaram o desenvolvimento em períodos bastantes precoces como 1 mês após início da terapia (Vescosi *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2005). A incidência do aumento gengival por CsA pode variar de 8 a 81% entre os pacientes que fazem uso da droga, dependendo do critério

utilizado para identificação do aumento gengival e do grupo de pacientes. Contudo, uma criteriosa revisão dos estudos publicados no assunto sugere uma incidência geral próxima de 25-30%. Então, a ocorrência dos aumentos gengivais induzidos por CsA parece ser a metade da frequência dos aumentos gengivais induzidos por fenitoína, e aproximadamente a mesma dos aumentos gengivais induzidos por bloqueadores de canais de cálcio (Boltchi *et al.*, 1999). A combinação farmacológica de CsA e nifedipina, um bloqueador de canais de cálcio, é freqüente e aumenta em 50% a prevalência dos aumentos gengivais, refletindo também na gravidade da lesão (Dongari-Bagtzoglou, 2004; Kataoka, *et al.*, 2005).

A grande variabilidade na incidência tão quanto na gravidade do aumento gengival induzido por CsA parecem ser dependentes da dosagem e tempo de utilização da droga, controle da placa bacteriana, níveis de inflamação gengival, susceptibilidade genética do indivíduo e capacidade de metabolismo da droga (Vescosi *et al.*, 2005). Alguns estudos sugerem que a placa bacteriana funciona como um reservatório de CsA, potencializando seus efeitos localmente (Niimi *et al.*, 1990). É sugerido que um efetivo controle na remoção da placa bacteriana e dos irritantes locais pode reduzir a gravidade do aumento gengival e prevenir a recorrência da lesão. Contudo, alguns estudos têm falhado em encontrar uma correlação entre a presença de placa bacteriana e a gravidade do aumento gengival. Adicionalmente, uma excelente higienização dental com efetivo controle de placa bacteriana parece não prevenir a indução do aumento gengival por CsA (Seymour & Smith, 1991).

Outro aspecto que contribui para a grande variabilidade na incidência dos aumentos gengivais é o tipo de órgão transplantado. Enquanto a prevalência é elevada em pacientes receptores de transplantes de órgãos sólidos como rins, a incidência é extremamente baixa (~2%) em receptores de medula óssea. A idade do paciente é outro fator que pode influenciar na incidência e gravidade do aumento gengival. Crianças e adolescentes são mais acometidos por aumento gengival quando fazem uso da droga comparado com adultos, sugerindo uma

possível relação entre CsA, hormônios sexuais e metabolismo do fibroblastos gengivais (Wright *et al.*, 2001). Embora seja bem estabelecido que os hormônios sexuais possam influenciar o metabolismo do tecido periodontal, os mecanismos por trás destes efeitos permanecem desconhecidos. Interessantemente, alguns estudos têm sugerido que testosterona apresenta um papel importante nos aumentos gengivais induzidos por nifedipina e fenitoína (Sooriyamoorthy & Gower, 1989; Sooriyamoorthy *et al.*, 1990) e na FGH (Coletta *et al.*, 2002).

Alguns estudos avaliaram a influência dos aspectos genéticos na predisposição ao desenvolvimento e na gravidade dos aumentos gengivais induzidos por CsA. Indivíduos que expressam o antígeno do linfócito humano (HLA) do tipo DR1 (HLA-DR1) apresentaram certo grau de proteção ao desenvolvimento do aumento gengival induzido por CsA, enquanto que indivíduos com os genótipos HLA-DR2, HLA-A19 e HLA-B37 foram mais susceptíveis ao desenvolvimento do aumento gengival (Thomason *et al.*, 1996b). Recentes estudos demonstraram uma significativa associação entre polimorfismo do gene TGF- β 1 e o aumento gengival induzido por CsA (Linden *et al.*, 2001; Radwan-Oczko *et al.*, 2006). Linden *et al.* (2001) demonstraram que os indivíduos heterozigotos na posição +915, códon 25 de TGF- β 1 (um alelo expressando arginina e outro prolina) que faziam uso de CsA apresentavam um aumento gengival significativamente mais grave que indivíduos homozigotos. Similarmente, pacientes com polimorfismo no códon 10 (posição +869) de TGF- β 1 e produtores de níveis elevados desta citocina foram considerados um fator de risco para o desenvolvimento do aumento gengival após uso de CsA (Radwan-Oczko *et al.*, 2006).

As características histológicas dos aumentos gengivais induzidos por CsA são similares aos aumentos gengivais induzidos por outras drogas e aos aumentos encontrados em pacientes com FGH, e compatíveis com uma alteração na quantidade de tecido conjuntivo fibroso. O tecido conjuntivo é caracterizado por um acúmulo excessivo de feixes de fibras colágenas arranjadas em todas as direções, os quais são permeados por um grande número de vasos sangüíneos e

graus variados de células inflamatórias. A principal célula inflamatória é o plasmócito, com um pequeno número de linfócitos que se localizam principalmente próximo ao epitélio juncional. Áreas focais de degeneração mixomatosa do tecido conjuntivo fibroso têm sido observada em regiões subjacentes ao tecido epitelial (Spolidorio *et al.*, 2001; Mariani *et al.*, 2004). Avaliações histomorfométricas têm confirmado que os aumentos gengivais induzidos por CsA são resultados de um significativo aumento no número de fibras colágenas e outros componentes da MEC. Contudo, estas análises são controversas quanto ao aumento na densidade de fibroblastos no tecido conjuntivo (Spolidorio *et al.*, 2001). Nossos resultados prévios demonstraram um significativo aumento na densidade de fibroblastos em aumentos gengivais induzidos por CsA em ratos e, mesmo após 90 dias da parada do tratamento, a densidade dos fibroblastos foi maior que o tecido gengival controle (Spolidorio *et al.*, 2001). A análise ultra-estrutural do tecido conjuntivo dos aumentos gengivais induzidos por CsA revelou a presença de fibroblastos com uma intensa atividade de síntese e secreção protéica, sugerindo um aspecto miofibroblástico (Yamazaki *et al.*, 1987).

Recobrimo o tecido conjuntivo encontra-se um epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado com variados graus de hiperplasia e com formação de longas e delgadas criptas que se adentram ao tecido conjuntivo subjacente (Spolidorio *et al.*, 2001). Embora tenha sido demonstrado um significativo aumento no número de células de Langerhans intra-epitelialmente e imediatamente adjacente aos sítios inflamados (Savage *et al.*, 1987), um recente estudo sugeriu que estas células são funcionalmente incompetentes, devido à ausência de grânulos de Birbeck (Mariani *et al.*, 2004).

Os mecanismos biológicos envolvidos na etiopatogênia dos aumentos gengivais induzidos por CsA permanecem desconhecidos, contudo nossos conhecimentos estão evoluindo. Inúmeros estudos têm demonstrado que CsA e seus metabólitos ativos exercem seus efeitos diretamente sobre os fibroblastos gengivais (Cotrim *et al.*; 2003, Bostrom *et al.*, 2005) e, como apenas aproximadamente 30% dos usuários de CsA desenvolvem o aumento gengival, é

hipotetizado que CsA ativa ou seleciona subpopulações específicas de fibroblastos. Como ponto de unanimidade existe que CsA altera os processos de metabolismo e/ou catabolismo de colágeno. Diversas características que controlam estes fenômenos como cinética de crescimento celular, produção de citocinas e fatores de crescimento, atividade fagocitária, indução de apoptose, expressão de MMPs e seus inibidores teciduais (TIMPs), além da própria análise na produção de colágeno têm sido estudadas em culturas celulares de fibroblastos tratadas com CsA. CsA estimulou a proliferação celular de fibroblastos gengivais em concentrações similares aos níveis séricos de pacientes que fazem o uso da droga (100 e 200 ng/ml). Porém, em concentrações elevadas (400 e 800 ng/ml), a proliferação dos fibroblastos gengivais foi inibida (Cotrim *et al.*, 2003). Estes autores também demonstraram que o efeito de CsA na indução da proliferação celular é dependente de TGF- β 1, visto que o bloqueio de TGF- β 1 com oligonucleotídeos antisense preveniu o efeito de CsA na estimulação da proliferação celular. Em corroboração, a capacidade de CsA em estimular a síntese de DNA e a proliferação celular foram confirmadas em outros estudos (Yoshida *et al.*, 2005; Chae *et al.*, 2006) e esta habilidade foi mantida mesmo na presença dos lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, que normalmente inibem a proliferação de fibroblastos gengivais (Bartold, 1989). Recentemente, Yoshida *et al.* (2005) demonstraram em culturas celulares de tecido gengival de ratos que o efeito de CsA na indução da proliferação celular é acompanhado por um aumento na expressão de fatores de crescimento, como TGF- β 1 e FGF-2. Contudo, um estudo demonstrou que o efeito de CsA na proliferação de fibroblastos gengivais é variável e dependente da linhagem celular. Este estudo demonstrou que CsA estimulou, inibiu ou não modificou a proliferação celular (para revisão ver Hallmon & Rossmann, 1999).

Como citado anteriormente, o acúmulo de tecido conjuntivo fibroso, principalmente colágeno, é um resultado encontrado com frequência em estudos envolvendo o aumento gengival induzido por CsA. Segundo alguns autores, este acúmulo é resultado de uma excessiva produção de colágeno acompanhada por

uma inibição na sua degradação. Gagliano *et al.* (2004) demonstraram que culturas celulares de fibroblastos de GN quando submetidas ao tratamento com CsA estimulavam a expressão e produção de colágeno tipo I, acompanhado por uma diminuição na produção de MMP-1, a principal enzima responsável pela sua degradação. Kataoka *et al.* (2000), utilizando tecidos gengivais de ratos tratados com CsA, observaram através de análises imunohistoquímicas, um aumento gradativo na densidade dos feixes de fibras de colágeno tipo I, o qual foi acompanhado por uma diminuição na expressão das collagenases. Alguns estudos demonstraram uma significativa inibição da atividade das MMPs devido a ação de CsA. Bolzani *et al.* (2000) demonstraram uma intensa diminuição na atividade de MMP-1 e MMP-2 em tecidos gengivais de ratos Wistar tratados com CsA. Estes autores também observaram uma diminuição na atividade gelatinolítica de MMP-2 e na produção de MMP-1 e MMP-3 em culturas celulares humanas de GN tratadas com CsA. Cotrim *et al.* (2002) demonstraram uma inibição na expressão de MMP-1 e MMP-2 por culturas celulares humanas tratadas com CsA em uma maneira dose-dependente. Contudo, alguns estudos demonstraram que o acúmulo de colágeno nos aumentos gengivais induzidos por CsA não se deve somente a um aumento na sua expressão ou degradação através de MMPs, pois há uma inibição do processo de fagocitose mediado por fibroblastos. Arora *et al.* (2001) demonstraram uma diminuição da atividade fagocitária de fibroblastos gengivais quando submetidos ao tratamento com CsA. Um estudo realizado *in vivo* em tecidos gengivais de ratos submetidos ao tratamento com CsA demonstrou que a inibição da atividade fagocitária dos fibroblastos gengivais é acompanhada por um acúmulo excessivo de tecido conjuntivo fibroso (Kataoka *et al.*, 2000).

Pesquisas realizadas em humanos e em modelos animais sugerem que os efeitos colaterais associados ao uso de CsA são decorrentes da capacidade da droga estimular a expressão de TGF- β 1. Estudos *in vitro* demonstraram que CsA é capaz de estimular a síntese de TGF- β 1 em linfócitos T, células proximais tubulares e em fibroblastos tubulo-intersticiais (Shin *et al.*, 1998; Waiser *et al.*, 2002). Modelos animais realizados em ratos e coelhos demonstraram um aumento

na expressão de TGF- β 1 nos compartimentos tubulo-intersticial e vascular quando submetidos ao tratamento com CsA (Chen *et al.*, 2005). Waiser *et al.* (2002) demonstraram que o aumento na expressão de TGF- β 1 é dose e tempo dependente em culturas de células mesenquimais renais de ratos tratadas com CsA. Nossos estudos realizados em culturas celulares de fibroblastos de GN demonstraram que CsA, em concentrações similares aos níveis séricos de pacientes que fazem uso da droga, estimula a expressão e produção de TGF- β 1, que de uma maneira autócrina, inibe significativamente a produção e atividade de MMPs, sugerindo que TGF- β 1 é um regulador chave dos mecanismos bioquímicos associados a patogênese do aumento gengival induzido por CsA (Cotrim *et al.*, 2002). Nós também demonstramos que a proliferação dos fibroblastos gengivais é influenciada via indução de TGF- β 1, visto que ao bloquear os efeitos deste fator, os efeitos de CsA sobre a proliferação celular é significantemente reduzido (Cotrim *et al.*, 2003). Adicionalmente, Spolidorio *et al.* (2005) demonstraram um aumento dos níveis de TGF- β 1 na saliva de ratos tratados com CsA.

O principal tratamento para o aumento gengival induzido por CsA continua sendo cirúrgico, com a realização das técnicas de gengivectomia e gengivoplastia. O tratamento a laser também está sendo utilizado para a excisão do tecido gengival, porém o uso desta técnica dispense custos maiores. O uso de antibióticos tópicos e sistêmicos para reduzir a severidade da condição e prevenir as recorrências depois da cirurgia vem sendo estudado. Um pequeno grupo de pacientes transplantados renais que desenvolveram o aumento gengival após a utilização de CsA responderam de forma satisfatória ao tratamento sistêmico por 7 dias com metronidazol (Seymour, 2000). Azitromicina é outro medicamento que vem sendo avaliado para o tratamento desta condição, demonstrando resultados satisfatórios quando utilizado em períodos precoces da doença, na dosagem de 500 mg/dia (Gomez *et al.*, 1997; Kwun *et al.*, 2003). Um estudo recente demonstrou resultados benéficos aos pacientes com aumento gengival induzido por CsA ao adicionar azitromicina ao creme dental (Argani *et al.*, 2006).

3. Proposição

Os objetivos deste estudo foram:

1. Avaliar os efeitos de TGF- β 1 na transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos e analisar a importância da ativação de CTGF para este processo.
2. Determinar os efeitos de IFN γ na transdiferenciação dos fibroblastos de GN em miofibroblastos e compreender os mecanismos de ação deste fator neste processo.
3. Caracterizar a presença dos miofibroblastos em aumentos gengivais induzidos por CsA em ratos Wistar e determinar *in vitro* os mecanismos de ação de CsA neste processo.

4. Materiais e Métodos

4.1 Aprovações dos Comitês de Ética

Todos os experimentos deste estudo foram realizados de acordo com as normas relativas à ética em pesquisa envolvendo seres humanos e animais, deliberações do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP (processo 141/2006) (Anexo) e da Comissão de Ética na Experimentação Animal, CEEA-IB-UNICAMP (processo 723-1) (Anexo).

4.2. Culturas Celulares Humanas e Tratamentos

Culturas celulares primárias de fibroblastos humanos de GN e de FGH foram previamente estabelecidas e encontravam-se armazenadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Cultura Celular da Área de Patologia Oral da FOP-UNICAMP. As células foram descongeladas e cultivadas em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) acrescido de 10% de soro fetal bovino (FBS) (Cultilab Ltda, Campinas, SP), 100 µg/ml de penicilina e 120 µg/ml de kanamicina sulfatada e mantidas a 37°C em uma atmosfera úmida contendo 5% CO₂.

IFN γ e TGF- β 1 liofilizados (R&D Systems, Mineapólis, MN, EUA) foram dissolvidos em meio de cultura, aliquotados e armazenados a -80°C. Para avaliar o efeito destas citocinas na transdiferenciação dos miofibroblastos, as células foram mantidas em meio de cultura contendo 0,1% de FBS e TGF- β 1 nas concentrações variando de 0 a 10 ng/ml ou IFN γ nas concentrações de 0 a 10⁶ U/ml durante 3 dias. Para avaliar a influência do tempo na ação das citocinas, as células foram tratadas com TGF- β 1 na concentração de 10 ng/ml e IFN γ na concentração de 10⁶ U/ml por 1, 2 e 3 dias. Tratamentos concomitantes com TGF- β 1 e IFN γ também foram realizados.

Para determinar o efeito de CsA (50 mg/ml, Sandimmun-Novartis, Brasil), a droga foi diretamente adicionada ao meio de cultura contendo 0,1% de FBS nas concentrações de 200 e 1000 ng/ml e mantida por um período de 5 dias. No

terceiro dia um meio de cultura novo contendo as mesmas concentrações de CsA foi adicionado as células.

4.3. Modelo Animal de Indução do Aumento Gengival

Vinte ratos Wistar machos provenientes do Biotério Central da UNICAMP foram divididos em 2 grupos: grupo controle que recebeu injeções subcutâneas diárias de solução salina e o grupo tratado que recebeu injeções subcutâneas diárias de CsA (50 mg/ml, Sandimmun-Novartis, Brasil) na concentração de 10 mg/Kg. O tratamento foi mantido por 60 dias, sendo que o peso dos animais foi conferido semanalmente para ajuste do volume da droga. Transcorrido o período do tratamento, os animais foram sacrificados, o tecido gengival cuidadosamente removido da região vestibular e lingual/palatina dos molares superiores e inferiores e fixado em solução aquosa contendo 10% formalina tamponada com PBS (salina tamponada com fosfato). Após 6 h de fixação, o material foi desidratado, diafanizado e embebido em parafina. Cortes histológicos de 3 μ m foram corados em hematoxilina & eosina (H&E) ou submetidos a reações de imunohistoquímica. O tecido gengival de 2 animais adicionais de cada grupo foram imersos em meio de cultura e utilizados para estabelecimento das culturas celulares, como descrito abaixo.

4.4. Estabelecimento das Culturas Celulares de Fibroblastos Derivadas de Aumentos Gengivais Induzidos por CsA em Ratos

Os fragmentos gengivais removidos durante o procedimento cirúrgico foram imediatamente imersos em DMEM acrescido de 10% FBS, 125 mg/ml ampicilina e 50 ng/ml anfotericina B a 4°C e levados imediatamente à geladeira, onde foram mantidos por 16 h. Os fragmentos foram lavados 3 vezes na mesma solução, cortados em fragmentos de aproximadamente 1 mm³ e transferidos para frascos de cultura de 25 cm², que foram mantidos a temperatura de 37°C, atmosfera úmida contendo 5% CO₂. O crescimento celular foi monitorado diariamente e o meio de cultura trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular.

Após atingirem a confluência, as células foram subcultivadas com procedimentos de rotina.

4.5. Imunohistoquímica

As reações de imunohistoquímica para α -SMA foram realizadas utilizando o método indireto com o sistema de amplificação ABC. Resumidamente, os cortes histológicos foram diafanizados em xilol por 30 min em estufa a 60°C e em temperatura ambiente por mais 20 min. Posteriormente foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol, lavados em água destilada e incubados com solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 10% em 5 trocas de 5 min com a finalidade de bloquear a peroxidase endógena. Previamente a incubação com o anticorpo primário anti- α -SMA humano (clone 1A4, Dako Corp., Carpeteria, CA, EUA) na concentração de 1/400, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica através do tratamento com 10 mM de ácido cítrico pH 6,0 e aquecimento em microondas em 2 ciclos de 12 min. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e incubados com anticorpo secundário conjugado a biotina na diluição de 1/500 por 30 min a 37°C. Após nova lavagem em PBS, os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-biotina na diluição de 1/500 por 30 min a 37°C (Strept ABC Complex/HRP Duet, Mouse/Rabbit, Dako). A reação foi revelada com solução aquosa de 3,3 diaminobenzidina tetrahydroclorato (DAB, Sigma, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 120 mg/ml acrescida de 0,01% de peróxido de hidrogênio e 0,01% dimetil sulfoxido (DMSO). As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Carazzi. Controles negativos foram realizados com a omissão do anticorpo primário.

4.6. Análise de Western Blot

A técnica de western blot foi utilizada para análise da produção do marcador específico da transdiferenciação de miofibroblastos α -SMA. Culturas celulares foram coletadas, lavadas em PBS e incubadas com tampão de lise RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% deoxicolato

de sódio, 0,5% sódio dodecil sulfato (SDS), 1 mM fluoreto de metilfenilsulfonil (PMSP), 1 mM N-etilmaleimida, 1 mM ditioneitol (DTT), 10 mg/ml inibidor de tripsina, 1 mg/ml leupeptina e 1 mg/ml aprotinina). Após centrifugação e determinação da dosagem protéica pelo método de Bradford (Bradford, 1972), 50 µg de proteína total de cada amostra foram misturados com tampão de amostra redutor (2% SDS, 125 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glicerol, 0,001% azul de bromofenol e 20% DTT), fervidos por 10 min e separados eletroforicamente em gel 10% SDS-PAGE (Laemmli, 1970). O material eletroforizado foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (poro de 0,45 µm; Invitrogen). As membranas foram tratadas por 2 h a temperatura ambiente ou por 16 h a 4°C com PBS acrescido de 10% leite desnatado e incubadas com anticorpos anti-α-SMA (Dako) por 2 h. Após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase e reveladas com o kit de quimioluminescência seguindo as recomendações do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL, EUA). A membrana foi então envolta por plástico e exposta ao filme radiográfico.

4.7. Análise Semi-Quantitativa de Transcriptase Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)

RNA foi extraído das culturas celulares pelo uso da técnica de isotiocianato de guanidina (Chomezynski & Sachi, 1987). Em essência, células foram lavadas em PBS e incubadas com TRIzol (Invitrogen) por 5 min. Após lise celular, as amostras foram coletadas e transferidas para tubos de polipropileno (livres de RNase e DNase) e 0,2 ml de clorofórmio por mililitro de solução desnaturante foi adicionado. Após centrifugação, a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para tubos limpos e adicionado 0,5 ml de álcool isopropílico por mililitro de solução desnaturante. A concentração e pureza dos RNAs foram determinadas por espectrofotometria a 260/280 nm (espectrofotômetro Genesys 2, Spectronic Inst., Rochester, NY, EUA), enquanto que a integridade foi verificada em gel de agarose/MOPS/formaldeído.

Três microgramas de RNA total foram transcritos reversamente a cDNA depois de misturados a uma solução contendo 1 µl de Oligo-dT (0,5 mg/ml), 4 µl de 5x tampão de síntese (200 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl), 1 µl da mistura de dNTPs, 2µl de 0,1 M de DTT, 1 µl de RNAase OUT (Invitrogen) e 1 µl de Superscript II RT (200 U/µl; Invitrogen). A mistura foi incubada por 50 min a 42°C e posterior 15 min a 70°C. O cDNA resultante foi amplificado em um termociclador (modelo 9600, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em uma reação composta por 1 µM de cada primer, 2 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTPs e 0,025 U/µl Taq DNA polimerase. A média linear de amplificação para cada gene foi determinada através da realização de seis reações iguais, porém amplificadas por diferentes números de ciclos (20, 25, 30, 35, 40, 45 ciclos). Para todos os genes, foi selecionado o ciclo que se encontrava na fase exponencial da reação em cadeia da polimerase (PCR). Sequências dos primers e condições das reações de PCR são descritas na tabela 1. Os produtos de PCR foram corados com brometo de etídeo e separados eletroforéticamente em gel de 1% agarose/TAE (tampão Tris-Ácido acético-EDTA).

Tabela 1. Sequências dos primers e condições das reações de RT-PCR

Gene	Sequência (5'-3')	Temperatura de Anelamento (°C)	Número de Ciclos	Tamanho do Produto (pb)
α -SMA	F:GCTCACGGAGGCACCCCTGAA R:GTCATAGGACATTGTTAGCAT	61	40	589
Colágeno tipo 1	F:CTGGCAAAGAAGGCGGCAAA R:CTCACCACGATCACCCTCT	58	25	503
TGF- β 1	F:AAGTGGATCCAGGAGCCCAA R:GCTGCACTTGCAGGAGCGCAC	55	30	247
CTGF	F:AACTATGATTAGAGCCAACTGCCTG R:TCATGCCATGTCTCCGTACATCTTC	55	35	477
Smad 6	F:GCTACCAACTCCCTCATCACT R:CGTCGGGGAGTTGACGAAGAT	58	35	262
Smad 7	F:CGTCCACGGCTGCTGCATAA R:ATGCTGTGCCTTCCTCCGCT	58	30	293
GAPDH	F:GAAGGTGAAGGTCGGAGTC R:GAAGATGGTGATGGGATTTC	55	30	226

4.8. Imunofluorescência

Células foram plaqueadas em uma lâmina de cultura celular de 8 poços (Lab Tek, Nunk, Naperville, IL, EUA) contendo 5×10^3 células por poço e incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24 h. Seguindo a incubação por 3 dias em meio contendo 0,1% de FBS e 10 ng/ml de TGF-β1 e/ou 10^6 U/ml de IFN γ , as células foram lavadas em PBS e fixadas em etanol a 70% por 15 min. Para prevenir ligações inespecíficas, as células foram bloqueadas com 3% albumina sérica bovina (BSA, Sigma) em PBS por 1 h. As células foram incubadas por 1 h com o anticorpo anti-α-SMA em uma diluição de 1:100, seguido pela incubação com o anticorpo anti-IgG conjugado com fluoresceína (Vector Labs, Burlingame, CA, EUA) em uma diluição de 1:250. As células foram montadas com Vectashield contendo DAPI (Vector Labs) e examinadas em um fotomicroscópio equipado com epifluorescência (DMR Microscope, Leica Microsystem, Nussloch, Germany). Para a geração das imagens fluorescentes, as células foram estimuladas com feixe de luz a 480/40 nm e foram coletadas com filtro de passagem em banda de 527/30. Células não incubadas com o anticorpo primário foram usadas como controle negativo da reação.

4.9. Citometria de Fluxo

Após tripsinização, a suspensão celular foi fixada em etanol a 70% e incubada com anticorpos anti-α-SMA e anti-IgG conjugado a fluoresceína como descrito anteriormente. As células foram lavadas, ressuspensas em PBS e analisadas em um citômetro de fluxo FACScalibur equipado com laser de argônio (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Um número mínimo de 10.000 eventos foi coletado em cada amostra e apenas as células com características de fibroblastos intactos foram incluídas na análise. A porcentagem de células positivas para α-SMA foi calculada com o auxílio do software CellQuest (Becton Dickinson). É importante ressaltar que os experimentos de citometria de fluxo foram realizados em nosso laboratório em Piracicaba, mas analisados no citômetro de fluxo do

laboratório do Dr. Aníbal Vercesi, na Faculdade de Medicina-UNICAMP, em Campinas.

4.10. ELISA para Colágeno Tipo I

Para determinar a atividade dos miofibroblastos, a produção de colágeno tipo I foi avaliada por ELISA. Resumidamente, após tratamento o meio de cultura foi coletado e as células foram lisadas em 0,5 M ácido acético por 30 min a 4°C. O meio de cultura e as células foram misturados, liofilizados e reconstituídos em ácido acético. As amostras foram diluídas 100 vezes e aplicadas para sensibilizar placas de ELISA de 96-poços por 2 h. Os poços foram lavados e sítios ligantes não-específicos foram bloqueados com BSA a 3% em PBS por 2 h. Após 3 lavagens com solução de PBS contendo Tween 20 a 1%, foi adicionado os anticorpos anti-colágeno tipo I humano conjugado à biotina (Chemicon Int., Temecula, CA, EUA) na diluição de 1:2.000 por 2 h. Após outra etapa de lavagem, foi adicionado estreptavidina conjugada à peroxidase (Vector Labs) na concentração de 1:500 por 1 h. As reações foram reveladas pela adição de 200 µl da solução de 0,2 mg/ml de o-fenilenodiamina em 0,1 M de tampão fosfato-citrato pH 5.0 contendo 0,05% H₂O₂. A reação foi finalizada pela adição de 2 N H₂SO₄ e a absorbância avaliada a 490 nm utilizando um leitor automático de ELISA (Bio Rad, Hercules, CA, EUA). Paralelamente, outra placa foi conduzida da mesma maneira e utilizada para determinar o número de células por poço. Uma curva padrão foi construída utilizando colágeno tipo I purificado da placenta humana (Chemicon Int.) e os valores expressos como ng de colágeno tipo I/célula.

4.11. Técnica de RNA de Interferência (siRNA-small interference RNA)

Para determinar o papel de CTGF na transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos via TGF-β1, nós examinamos o efeito da transfecção de siRNA CTGF na expressão de α-SMA induzida por TGF-β1. As moléculas de RNA foram quimicamente sintetizadas, aneladas e purificadas industrialmente (Invitogen). Foram utilizadas 3 seqüências alvo para CTGF (NM_001901),

correspondentes aos nucleotídeos 746-770 (5' AAA CGT GTC TTC CAG TCG GTA AGC C 3'), 1027-1051 (5' TTA GCT CGG TAT GTC TTC ATG CTG G 3') e 1135-1159 (5' ATC ATG TTC TTC TTC ATG ACC TCG C 3'). Resumidamente, fibroblastos da linhagem GN1 foram plaqueados a uma confluência de 50% e transfectados com 100 nM da mistura contendo partes iguais das 3 seqüências de siRNA CTGF, utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante. Em paralelo, células foram transfectadas com uma seqüência não-específica de siRNA, o qual continha a mesma proporção de nucleotídeos citosina e guanina para ser usado como controle negativo da reação. Depois de 30 h de transfecção, as células foram lavadas em PBS e incubadas com TGF- β 1 por 48 h. As condições do experimento foram as seguintes: seqüência não-específica do siRNA, seqüência não-específica do siRNA mais 10 ng/ml de TGF- β 1 e siRNA CTGF mais 10 ng/ml de TGF- β 1. Os níveis de mRNA para CTGF foram analisados por RT-PCR e os níveis protéicos de α -SMA foram analisados por western blot.

4.12. Análise Densitométrica

Para quantificação das bandas dos ensaios de RT-PCR, os géis foram documentados e analisados no sistema de fotodocumentação Kodak Digital ScienceTM equipado com a câmera digital DC120 e com o programa 1D Image Analysis (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, EUA). Os filmes radiográficos contendo os resultados dos ensaios de western blot foram escaneados no Scanner Model GS-700 Imaging Densitometer (Bio Rad) e as bandas analisadas com auxílio do programa Molecular AnalystTM (Bio Rad). O valor da densidade óptica foi calculado levando em consideração à área e a intensidade de cada banda. A normalização foi realizada dividindo o valor da densidade óptica da banda de interesse pelo valor do gene/proteína controle (GAPDH para os ensaios de RT-PCR e β -actina para os ensaios de western blot).

4.13. Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados, pelo menos, 2 vezes. Os resultados utilizados na comparação estatística representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 repetições independentes. Em todas as análises, $p \leq 0,05$ foi considerado como indicativo de diferença estatisticamente significativa.

5. Resultados

5.1. TGF- β 1 Induz a Transdiferenciação de Miofibroblastos Metabolicamente Ativos em Culturas Celulares de Fibroblastos de GN

Muitos estudos sugerem que TGF- β 1 é um potente indutor da transdiferenciação de miofibroblastos, porém o seu efeito em culturas celulares de gengiva e o seu exato mecanismo de ação permanecem desconhecidos. Para avaliar o efeito de TGF- β 1 na transdiferenciação de miofibroblastos em culturas celulares de GN, a linhagem de fibroblastos GN1 foi incubada com concentrações crescentes de TGF- β 1 e por vários períodos de tempo em meio de cultura contendo níveis reduzidos de FBS (concentração de 0,1%). Seguindo o período de incubação, as células foram coletadas e utilizadas para a extração de RNA e análise por RT-PCR ou para a extração de proteína total e análise por western blot. Nestes experimentos a identificação dos miofibroblastos foi determinada pela quantificação da expressão e produção de α -SMA. Como revelado na Figura 1A e 1C, TGF- β 1 induziu a expressão de α -SMA em uma maneira dependente da dose, com uma estimulação máxima de 10 vezes sobre células controle (não estimuladas com TGF- β 1) na concentração de 10 ng/ml. Interessantemente, a análise por western blot revelou que TGF- β 1 induz a produção de α -SMA apenas nas concentrações de 1 e 10 ng/ml (Fig. 1B). Na concentração de 1 ng/ml de TGF- β 1 a indução foi pequena, enquanto que na concentração de 10 ng/ml a estimulação de α -SMA foi aproximadamente 10 vezes maior comparada com células controle (Fig. 1D). Adicionalmente, observou-se que a indução da transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos por TGF- β 1 é tempo-dependente, com um máximo de estimulação da transdiferenciação após 72 h de tratamento (Fig. 2). Em um período de 24 h, a indução de α -SMA por TGF- β 1 foi mínima. Estes resultados sugerem que a indução da transdiferenciação de miofibroblastos por TGF- β 1 em culturas de fibroblastos gengivais é dependente da dose e do tempo de incubação, com uma concentração mínima de TGF- β 1 sendo necessária para este processo.

O efeito de TGF- β 1 na distribuição e proporção de células positivas para α -SMA foi examinado por imunofluorescência e citometria de fluxo. Culturas de fibroblastos gengivais demonstraram uma pequena proporção de células com uma marcação perinuclear para α -SMA. O tratamento com 10 ng/ml de TGF- β 1 por 3 dias induziu o aparecimento de uma marcação com um intenso padrão estriado percorrendo toda a extensão do citoplasma celular (Fig. 3), o qual correlaciona com o padrão de fibras do estresse previamente descrito (Serini & Gabbiani, 1999). Células com um padrão perinuclear também foram observadas em culturas tratadas com TGF- β 1. Interessantemente, células negativas para a expressão de α -SMA foram observadas em culturas estimuladas ou não por TGF- β 1. Como esperado, células tratadas com TGF- β 1 demonstraram uma maior intensidade e um maior número de células positivas para α -SMA comparado com células controle (Fig. 4). Após o tratamento com TGF- β 1, culturas de GN demonstraram mais de 90% das células positivas para α -SMA.

Miofibroblastos são caracterizados por apresentarem uma intensa síntese de componentes da MEC, fatores de crescimento e proteases (Serini & Gabbiani, 1999; Phan, 2002). Para determinar se o efeito de TGF- β 1 na transdiferenciação dos miofibroblastos em culturas de fibroblastos gengivais é acompanhado por um aumento na atividade metabólica destas células, nós avaliamos a expressão e produção de colágeno tipo I por RT-PCR e ELISA, respectivamente. Após 3 repetições dos experimentos, observa-se que a transdiferenciação celular foi acompanhada por um aumento transcricional e traducional da produção de colágeno tipo I (Fig. 12). A produção de colágeno tipo I foi aproximadamente 4 vezes superior em miofibroblastos (células GN1 tratadas com TGF- β 1) comparada com culturas não tratadas usadas como controle. Estes resultados demonstram que TGF- β 1 induz a transdiferenciação de miofibroblastos metabolicamente ativos quando adicionado às culturas celulares de fibroblastos gengivais.

5.2. TGF- β 1 Induz a Transdiferenciação dos Miofibroblastos em uma Via Dependente de CTGF

Recentes estudos têm demonstrado que o efeito de TGF- β 1 na transdiferenciação dos miofibroblastos é dependente da estimulação transcricional de CTGF (Garret *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). Para examinar o efeito de TGF- β 1 na expressão de CTGF, a linhagem celular GN1 foi incubada com concentrações crescentes de TGF- β 1 e a expressão de CTGF mRNA foi analisada por RT-PCR. Como demonstrado na Fig. 5A, a expressão de CTGF foi significativamente induzida por TGF- β 1 nas concentrações de 0,01 a 10 ng/ml. Para melhor caracterizar este efeito, culturas de GN1 foram incubadas com 10 ng/ml de TGF- β 1 por períodos de 0, 12, 24, 48 e 72 h. A expressão de CTGF foi estimulada após 12 h de incubação com TGF- β 1, alcançando um platô após este período. Por outro lado, a expressão de α -SMA foi induzida apenas após 48 h, com um máximo de indução em 72 h após incubação com TGF- β 1 (Fig. 5B). Estes resultados sugerem que a indução de α -SMA por TGF- β 1 é posterior à indução de CTGF.

Para determinar se o efeito de TGF- β 1 na transdiferenciação dos miofibroblastos é dependente da ativação de CTGF, nós reduzimos a expressão de CTGF através de siRNA. Células foram transfectadas com complexos lipossômicos contendo fitas duplas de oligoribonucleotídeos específicos para CTGF ou seqüências inespecíficas usadas como controle. Seguindo a transfecção, células foram incubadas com 10 ng/ml de TGF- β 1. Quando as seqüências específicas para CTGF foram utilizadas, os níveis de CTGF mRNA foram significativamente inibidos comparado com células transfectadas com seqüências inespecíficas (Fig. 6A). Interessantemente, TGF- β 1 não estimulou a produção de α -SMA em células na qual a expressão de CTGF foi inibida por siRNA específicos (Fig. 6B). Estes resultados demonstram que o efeito de TGF- β 1 na transdiferenciação de miofibroblastos em culturas de fibroblastos gengivais é dependente de CTGF.

5.3. IFN γ Inibe Simultaneamente a Expressão de α -SMA e Colágeno Tipo I

Para avaliar o efeito de IFN γ sobre a expressão e produção de α -SMA pelas células de GN, a linhagem GN1 foi cultivada na presença de IFN γ . Células foram incubadas com concentrações de 0 a 10^6 U/ml de IFN γ durante 3 dias, seguido por extração do RNA total e análise por RT-PCR. Como podemos observar na Figura 7A, o tratamento com IFN γ resultou em uma redução nos níveis de mRNA para α -SMA em uma maneira dose-dependente. As dosagens de 10^5 e 10^6 U/ml inibiram significativamente a expressão de α -SMA. Para a confirmação destes resultados, nós realizamos experimentos de western blot para avaliar a produção de α -SMA pelas células GN1. Este experimento demonstrou que IFN γ drasticamente inibiu a produção de α -SMA quando comparado com as células controle (Fig. 7B). Quando as células da linhagem GN1 foram tratadas com 10^6 U/ml de IFN γ por vários períodos de tempo, os níveis do mRNA para α -SMA começavam a decair após 24 h de tratamento, apresentando os níveis mínimos após 72 h (Fig. 8A), enquanto que os níveis protéicos apresentavam uma inibição apenas após 72 h de tratamento (Fig. 8B).

A inibição de α -SMA por IFN γ nas células da linhagem GN1 foi acompanhada por um decréscimo nos níveis de expressão de colágeno tipo I. O tratamento destas células com IFN γ inibiu a expressão de colágeno tipo I em uma maneira dependente da dose, a partir da dosagem de 10^5 U/ml (Fig. 9). Estes resultados demonstram que IFN γ inibe simultaneamente a expressão de α -SMA e colágeno tipo I.

5.4. IFN γ Inibe a Transdiferenciação dos Miofibroblastos Induzida por TGF- β 1

Para determinar se IFN γ interfere na transdiferenciação de fibroblastos gengivais para miofibroblastos induzida por TGF- β 1, células foram concomitantemente incubadas com IFN γ e TGF- β 1. Como esperado, 10 ng/ml de TGF- β 1 estimularam e 10^6 U/ml de IFN γ inibiram a expressão e produção de α -SMA pelas células GN1. Interessantemente IFN γ bloqueou o efeito de TGF- β 1 na

indução da expressão de α -SMA, como revelado por RT-PCR e western blot (Fig.10). Como demonstrado anteriormente, o tratamento com 10 ng/ml de TGF- β 1 foi acompanhado por alterações morfológicas das células com a aquisição de fibras do estresse em seu citoplasma (Fig. 11B). O tratamento com IFN γ impediu esta alteração morfológica induzida por TGF- β 1, como evidenciado pela ausência do aspecto estriado positivo para α -SMA no citoplasma (Fig. 11D). Para demonstrar que o efeito de TGF- β 1 na síntese de colágeno tipo I por miofibroblastos é também inibida por IFN γ , nós realizamos RT-PCR e ELISA. Estes experimentos demonstraram que IFN γ significativamente reduz o efeito estimulador de TGF- β 1 na expressão e produção de colágeno tipo I (Fig. 12).

Para complementar os testes sobre os efeitos de IFN γ sobre a transdiferenciação dos miofibroblastos, nós determinamos se esta citocina é capaz de reverter os efeitos de TGF- β 1. Em células cultivadas com IFN γ durante 3 dias seguido por um período adicional de 3 dias com TGF- β 1, a expressão de α -SMA e colágeno tipo I foram dramaticamente reduzidas quando comparadas com as células tratadas com TGF- β 1 sem tratamento prévio com IFN γ (Fig. 13). Células tratadas com TGF- β 1 por 3 dias e posteriormente tratadas com IFN γ por mais 3 dias demonstraram uma redução mais sutil na expressão de α -SMA e colágeno tipo I. Interessantemente, quando as células de GN1 foram tratadas com 10 ng/ml de TGF- β 1 durante 3 dias, seguido de mais 3 dias na ausência desta citocina, a expressão e produção de α -SMA foram similares àquelas encontradas em células mantidas sob tratamento durante 6 dias (Fig.13).

5.5. IFN γ Bloqueia a Transdiferenciação dos Miofibroblastos Via Estimulação de Smad 7

Para determinar o mecanismo pelo qual IFN γ inibe o efeito de TGF- β 1 na indução da transdiferenciação dos miofibroblastos, nós realizamos a análise por RT-PCR. A hipótese levantada é de que IFN γ estaria bloqueando as etapas iniciais da via Smad de ativação de TGF- β 1, impedindo a fosforilação de Smad 3. Os

possíveis mediadores deste efeito são os membros Smad 6 e Smad 7, que atuam inibindo a via de ativação de TGF- β 1 (Faler *et al.*, 2006). Para responder esta pergunta, nós tratamos a linhagem celular GN1 com 10^6 U/ml de IFN γ por períodos de 0, 2, 4, 8 e 24 h. A expressão de Smad 7, mas não de Smad 6 foi significativamente estimulada pelo tratamento com IFN γ (Fig. 14). Os níveis de expressão de Smad 7 mRNA demonstraram após 2 h de tratamento um aumento de 3-4 vezes maior comparado com os níveis basais, decaindo progressivamente até 8 h após o tratamento e retornando a níveis similares aos níveis basais após este período (Fig. 14). A expressão de TGF- β 1 não foi alterada pelo tratamento com IFN γ . Em contraste, a expressão de CTGF foi marcadamente inibida após 4 h de tratamento com IFN γ , sugerindo que IFN γ atua inibindo a atividade de TGF- β 1. Por se tratar de períodos bastante curtos, os níveis de expressão de α -SMA não foram afetados. Então, a redução na expressão de CTGF acontece após o aumento nos níveis de expressão de Smad 7, sugerindo que IFN γ bloqueia a transdiferenciação dos miofibroblastos gengivais via estimulação de Smad 7, com conseqüente inibição da via TGF- β 1-CTGF.

5.6. IFN γ Inibe a Expressão de α -SMA e Colágeno Tipo I em Linhagens Celulares de Miofibroblastos Via Estimulação de Smad 7

Nós demonstramos previamente que miofibroblastos são componentes abundantes no tecido gengival de pacientes de uma família com portadores de FGH (Bitu *et al.*, 2006). Neste estudo também foi identificado que o fenótipo miofibroblástico é associado a uma elevada expressão de TGF- β 1 e CTGF. Como nossos resultados anteriores demonstraram que IFN γ bloqueia o efeito de TGF- β 1 na indução da transdiferenciação de fibroblastos gengivais em miofibroblastos, nós analisamos se IFN γ poderia reverter o fenótipo miofibroblástico das culturas celulares de miofibroblastos derivadas da gengiva de pacientes com FGH. Duas linhagens celulares de miofibroblastos (FGH1 e FGH2) foram tratadas por 3 dias com 10^6 U/ml de IFN γ , seguido por ensaios de western blot e imunofluorescência.

O tratamento com IFN γ drasticamente reduziu a expressão de α -SMA pelas 2 linhagens de miofibroblastos (Fig. 15A). Para determinar a durabilidade deste efeito, as linhagens celulares foram cultivadas, após o tratamento com IFN γ , por um período adicional de 2 e 6 dias sem a presença desta citocina. Este experimento demonstrou que a produção de α -SMA começa a aumentar após a remoção de IFN γ , mas ainda permanece menor que o controle após 6 dias (Fig. 15A). O ensaio de imunofluorescência confirmou este resultado, visto que IFN γ inibiu a produção de α -SMA associada à formação de fibras do estresse (Fig. 15B). Adicionalmente, o tratamento com IFN γ inibiu o metabolismo das linhagens de miofibroblastos, como revelado pela significativa inibição na produção de colágeno tipo I pelas células tratadas com 10^6 U/ml de IFN γ quando comparada com células sem tratamento (Fig. 16).

Para confirmar o mecanismo de ação de IFN γ na reversão do fenótipo miofibroblástico das linhagens de FGH, nós cultivamos a linhagem FGH1 com 10^6 U/ml de IFN γ por períodos curtos de tempo. Seguindo o tratamento, as células foram coletadas e submetidas ao isolamento de RNA, síntese de cDNA e amplificação por PCR dos genes Smad 6, Smad 7, CTGF, TGF- β 1, α -SMA e GAPDH (Fig. 17). Como identificado para a linhagem celular GN1, IFN γ significativamente estimulou a expressão de Smad 7 com posterior inibição de CTGF (Fig. 17). Os níveis de expressão de Smad 6, TGF- β 1 e α -SMA não foram significativamente alterados pelo tratamento com IFN γ . Estes resultados sugerem que IFN γ inibe miofibroblastos via estimulação de Smad 7 e conseqüente bloqueio da cascata TGF- β 1-CTGF.

5.7. Ausência de Miofibroblastos nos Aumentos Gengivais Induzidos por CsA em Ratos

Nossos resultados anteriores demonstraram que CsA, em oposto ao seu efeito principal de inibir IL-2, estimula a expressão e produção de TGF- β 1, que através de um efeito autócrino controla a elevada proliferação celular e atividade

de MMPs em culturas de fibroblastos gengivais (Cotrim *et al.*, 2002; Cotrim *et al.*, 2003). Como o aumento gengival induzido por CsA é caracterizado por um acúmulo de tecido conjuntivo fibroso e por um aumento na expressão de TGF- β 1, nós hipotetizamos que miofibroblastos poderiam estar associados aos aumentos gengivais induzidos por CsA. Para responder esta hipótese, nós utilizamos o modelo animal com ratos Wistar. Após 60 dias de tratamento com injeções subcutâneas diárias de CsA, todos os animais desenvolveram um evidente e generalizado aumento gengival que se estendia por toda a gengiva marginal livre e inserida. Os tecidos gengivais das regiões superiores e inferiores dos molares foram cirurgicamente removidos, fixados em formol, embebidos em parafina e analisados em cortes corados por H&E ou em reações de imunohistoquímica para a detecção da distribuição da proteína α -SMA. Histologicamente, os tecidos gengivais demonstraram um tecido conjuntivo fibroso denso bem vascularizado recoberto por um epitélio pavimentoso estratificado hiperparaqueratinizado e hiperplásico (Fig. 18B). Um aumento no número e na profundidade das criptas epiteliais também foi observado. Interessantemente, em nenhuma das amostras de ambos os grupos foi observado a presença de miofibroblastos (células positivas para α -SMA) no tecido conjuntivo fibroso (Fig. 18C e D). Por outro lado, todas as amostras revelaram positividade para α -SMA nas células musculares lisas que compõem as paredes dos vasos sangüíneos (controle positivo interno da reação) (Fig. 18C e D).

Como demonstrado em inúmeros estudos, o tecido gengival é composto por uma população heterogênea de fibroblastos, com subpopulações respondendo de forma específica a determinados estímulos (McCulloch & Bordin, 1991; Phipps, 1997). CsA tem demonstrado um efeito heterogêneo sobre culturas de GN no que tange a atividade de MMP1 (colagenase 1) e o seu inibidor tecidual (TIMP) (Kataoka *et al.*, 2000; Bolzani *et al.*, 2000; Cotrim *et al.* 2002; Gagliano *et al.* 2004) Adicionalmente, foi sugerido que CsA pode ativar e selecionar subpopulações específicas, as quais podem ser reativadas em cultura na presença da droga. Para analisar o efeito de CsA em culturas primárias isoladas de aumentos gengivais,

linhagens celulares foram estabelecidas a partir de fragmentos de aumentos gengivais e tecido gengival normal. Após o estabelecimento das linhagens celulares, as células foram cultivadas por 5 dias com 200 ng/ml de CsA e o efeito da droga na produção de α -SMA foi avaliado por western blot. É importante ressaltar que 200 ng/ml de CsA correspondem aos níveis sanguíneos encontrados em pacientes que fazem uso do medicamento para fins terapêuticos. Confirmando os resultados da análise imunohistoquímica, CsA não alterou a produção de α -SMA nas linhagens celulares de aumentos gengivais de ratos (Fig. 19).

5.8. Efeito de CsA na Transdiferenciação dos Miofibroblastos em Culturas de Fibroblastos Gengivais

Para confirmar que o aumento gengival induzido por CsA não tem a participação de miofibroblastos, nós utilizamos um modelo *in vitro* de tratamento de culturas primárias de GN com CsA. Cinco culturas primárias de fibroblastos gengivais normais foram tratadas com CsA nas concentrações de 200 e 1000 ng/ml em meio de cultura contendo 0,1% de FBS e cultivadas por 5 dias. No terceiro dia de tratamento, o meio foi repostado com a droga nas mesmas concentrações iniciais. A análise por RT-PCR demonstrou que CsA não induz a expressão de α -SMA em nenhuma das linhagens celulares de GN como indicativo da transdiferenciação dos miofibroblastos (Fig. 20A). A análise por western blot confirmou estes resultados, demonstrando que CsA não induz a produção de α -SMA (Fig. 20B). Outros períodos de incubação e protocolos de tratamento foram também testados sem efeito na indução da transdiferenciação dos miofibroblastos (dados não mostrados). Contudo, CsA induziu significativamente a expressão de TGF- β 1 em 4 das 5 linhagens celulares de GN (Fig. 21). Como sugerido na Fig. 1, um valor mínimo de TGF- β 1 é necessário para a indução da transdiferenciação dos miofibroblastos em culturas de fibroblastos gengivais. Então, existe a possibilidade que o efeito de CsA na indução de TGF- β 1 não alcance os valores mínimos necessários para a transdiferenciação dos miofibroblastos. Para avaliar esta hipótese, a linhagem GN1 foi simultaneamente tratada com 200 ng/ml de CsA

e TGF- β 1 nas concentrações de 1, 3 e 5 ng/ml por 5 dias, seguido por análise por western blot. A Figura 22 demonstra que CsA não intensificou o efeito de TGF- β 1 na transdiferenciação dos miofibroblastos gengivais.

Como demonstrado, CTGF é necessário para o efeito de TGF- β 1 na indução da transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos. Então, a não indução da transdiferenciação dos miofibroblastos em culturas de GN por CsA pode estar relacionada aos níveis de expressão de CTGF. Interessantemente, foi demonstrado previamente por imunohistoquímica que CTGF não está associado aos aumentos gengivais induzidos por CsA (Uzel *et al.*, 2001). O efeito de CsA na expressão de CTGF por fibroblastos gengivais é demonstrado na Figura 23. Estes resultados claramente demonstraram que CsA não induz a expressão de CTGF, mesmo induzindo à expressão de TGF- β 1.

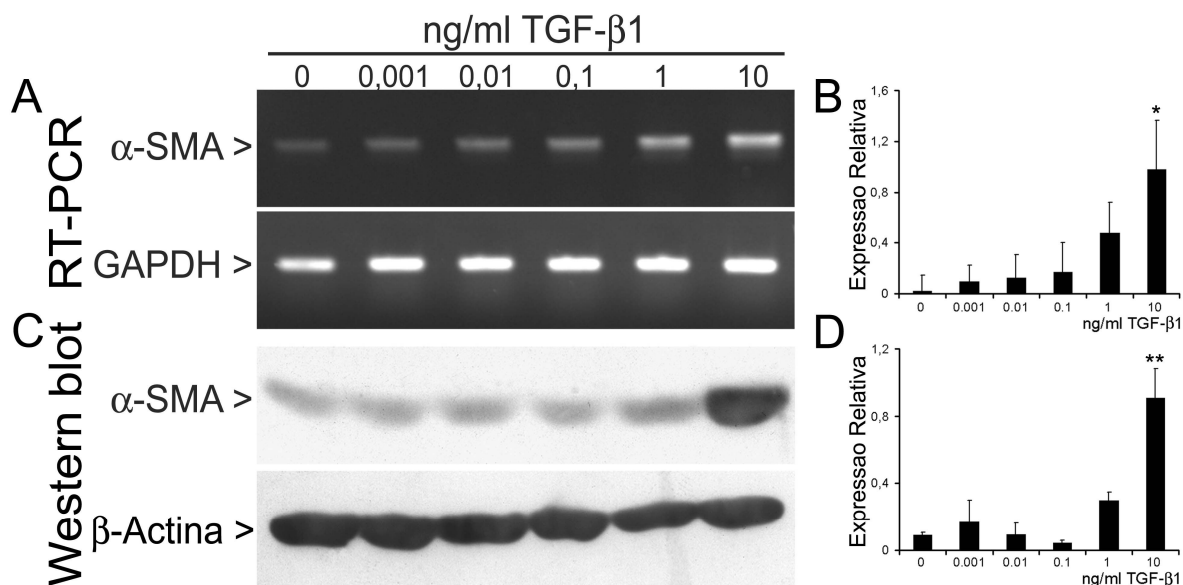


Figura 1. TGF-β1 induz a expressão e produção de α-SMA em culturas celulares de GN1 em uma maneira dose-dependente. Fibroblastos da linhagem GN1 foram mantidos em meio de cultura contendo 0,1% de FBS acrescido de concentrações crescentes de TGF-β1 (como indicado na figura) por 3 dias. Em seguida, as células foram coletadas e submetidas à técnica de RT-PCR **(A)** ou western blot **(C)** para avaliar a expressão e produção de α-SMA, respectivamente. **(B)** A análise densitométrica dos produtos de amplificação após normalização por GAPDH indicou uma indução máxima de aproximadamente 10 vezes na expressão de α-SMA por TGF-β1 na concentração de 10 ng/ml. **(D)** Sob o tratamento de 10 ng/ml de TGF-β1, pode-se observar um estímulo 10 vezes maior na produção de α-SMA comparado ao grupo controle. *p<0,05, **p>0,01

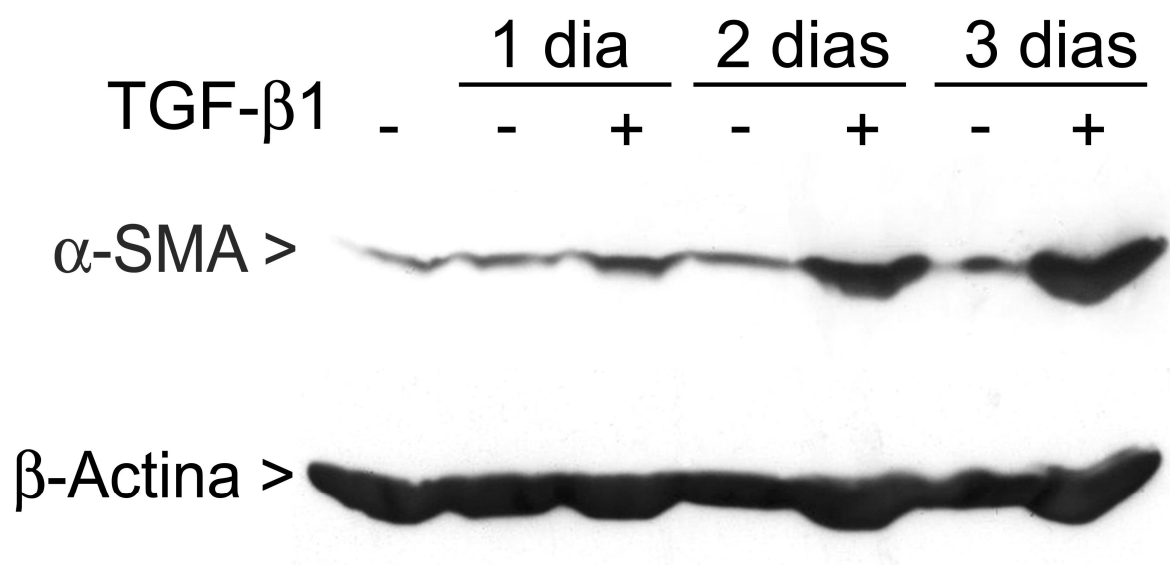


Figura 2. A estimulação de TGF- β 1 na produção de α -SMA é dependente do tempo. Culturas celulares de GN1 foram incubadas com 10 ng/ml de TGF- β 1 em meio de cultura contendo 0,1% de FBS e coletadas em vários períodos de tempo. Para cada período analisado existiu uma amostra controle sem TGF- β 1. Note um pequeno aumento na produção de α -SMA com 24 h de tratamento, porém um aumento significativo é visto transcorridos 72 h de tratamento.

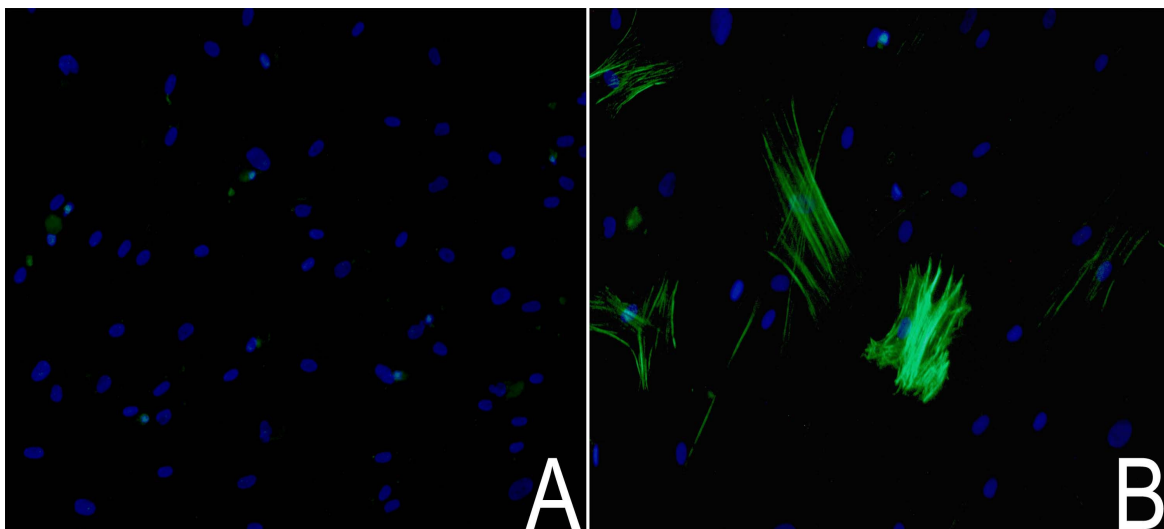


Figura 3. Efeito de TGF- β 1 na distribuição de α -SMA em fibroblastos da linhagem GN1. Células cultivadas por 3 dias com 10 ng/ml de TGF- β 1 em meio de cultura contendo 0,1% de FBS foram fixadas em 70% etanol, incubadas com anticorpos anti- α -SMA e então com anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados à fluoresceína. Após as incubações, as células foram montadas em Vectashield contendo o corante nuclear DAPI. A análise foi realizada no microscópio Leica equipado com epifluorescência. **(A)** células não estimuladas e **(B)** células estimuladas com 10 ng/ml de TGF- β 1. Células controle demonstraram uma marcação perinuclear, enquanto as células tratadas com TGF- β 1 demonstraram a formação de fibras do estresse, através do aspecto estriado presente no citoplasma celular. (x200)

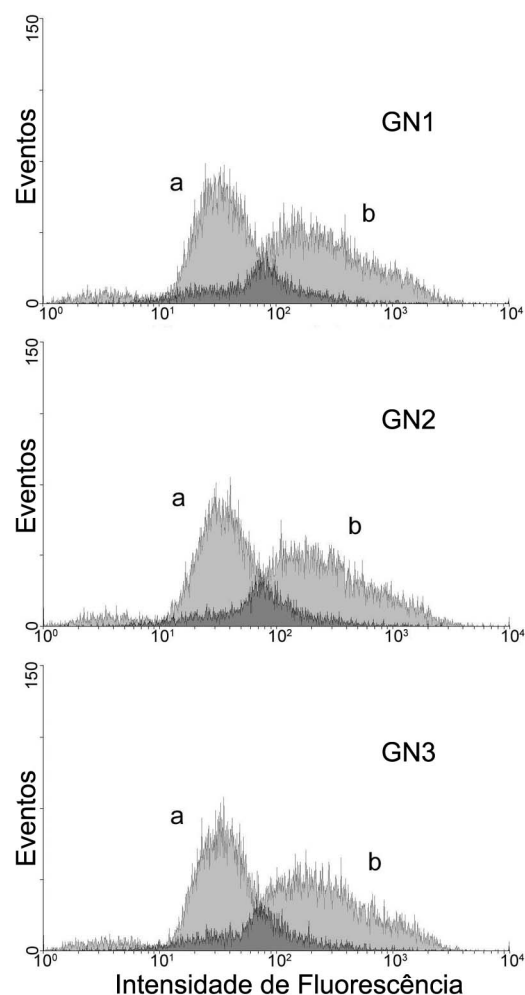


Figura 4. Análise por citometria de fluxo do efeito de TGF- β 1 na expressão de α -SMA. Três linhagens celulares de GN foram incubadas com 10 ng/ml de TGF- β 1 por 3 dias e então foram submetidas à análise por citometria de fluxo com os anticorpos anti- α -SMA e anti-IgG de camundongo conjugado à fluoresceína. (a) Células controle e (b) células tratadas com 10 ng/ml de TGF- β 1. O tratamento com TGF- β 1 estimulou uma marcação positiva para α -SMA em mais de 90% das células tratadas, observada na figura pelo desvio à direita do pico.

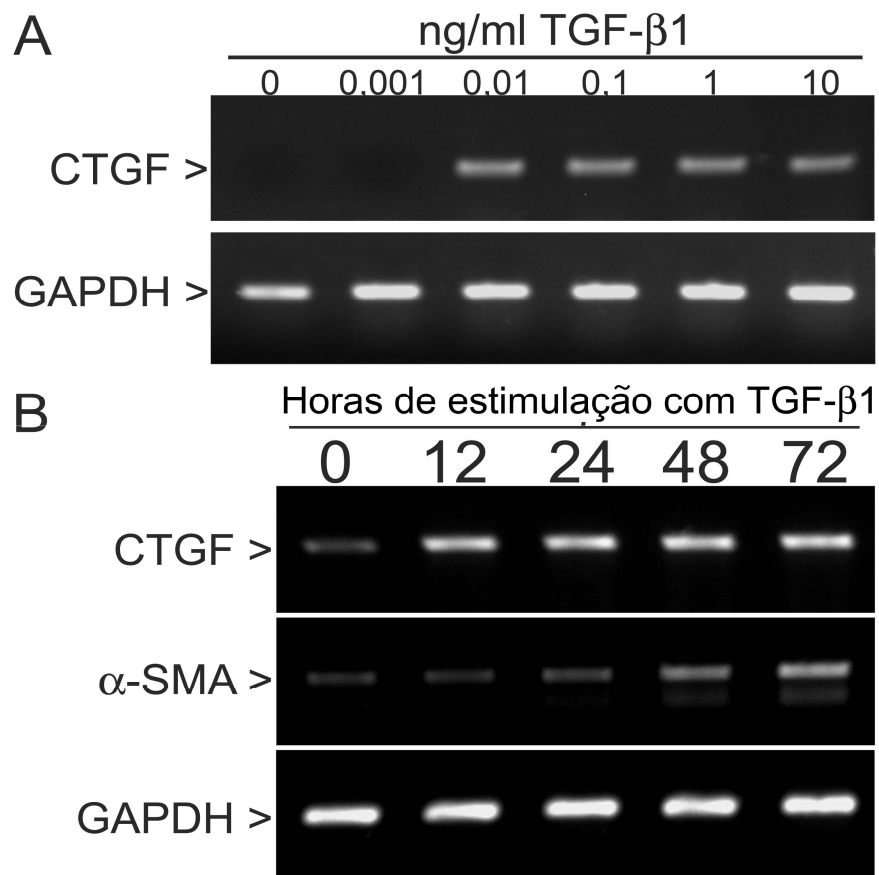


Figura 5. TGF- β 1 induz a expressão de CTGF e esta indução precede a transdiferenciação dos miofibroblastos. **(A)** Fibroblastos da linhagem GN1 foram incubados com concentrações crescentes de TGF- β 1 e a análise por RT-PCR foi realizada para determinar a expressão de CTGF mRNA. TGF- β 1 induziu drasticamente a expressão CTGF a partir da concentração de 0,01 ng/ml. **(B)** Células da linhagem GN1 foram cultivadas por vários períodos de tempo na presença de 10 ng/ml de TGF- β 1 e analisadas por RT-PCR para a expressão de CTGF e α -SMA. Observe que a expressão de CTGF é induzida após 12 h de tratamento com TGF- β 1, enquanto que a expressão de α -SMA inicia-se apenas 48 h após o tratamento com TGF- β 1.

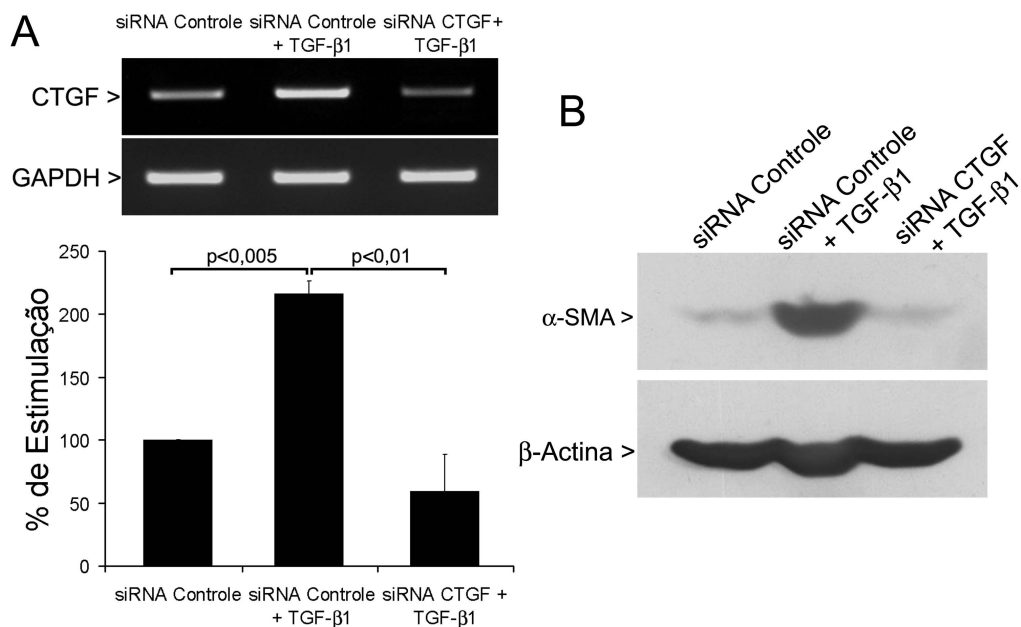


Figura 6. Efeito de TGF-β1 na indução da transdiferenciação de fibroblastos gengivais em miofibroblastos é dependente de CTGF. **(A)** Análise da efetividade de siRNA em bloquear os níveis de expressão de CTGF. siRNA controle e específico contra CTGF foram transfectados em fibroblastos da linhagem GN1 através de complexos lipossômicos e 30 h após a transfecção, células foram tratadas com 10 ng/ml de TGF-β1 por um período de 2 dias. Inserto na porção superior da figura representa uma das reações de RT-PCR, demonstrado que TGF-β1 não é capaz de induzir a expressão de CTGF em células tratadas com siRNA CTGF. Porção inferior representa a media $\pm$ desvio padrão da porcentagem relativa ao controle da expressão de CTGF, normalizada por GAPDH, de 3 experimentos independentes. **(B)** Análise representativa da reação de western blot de fibroblastos gengivais tratados simultaneamente com siRNA e TGF-β1. TGF-β1 não induziu a transdiferenciação dos miofibroblastos em culturas onde a expressão de CTGF foi significativamente inibida por siRNA CTGF.

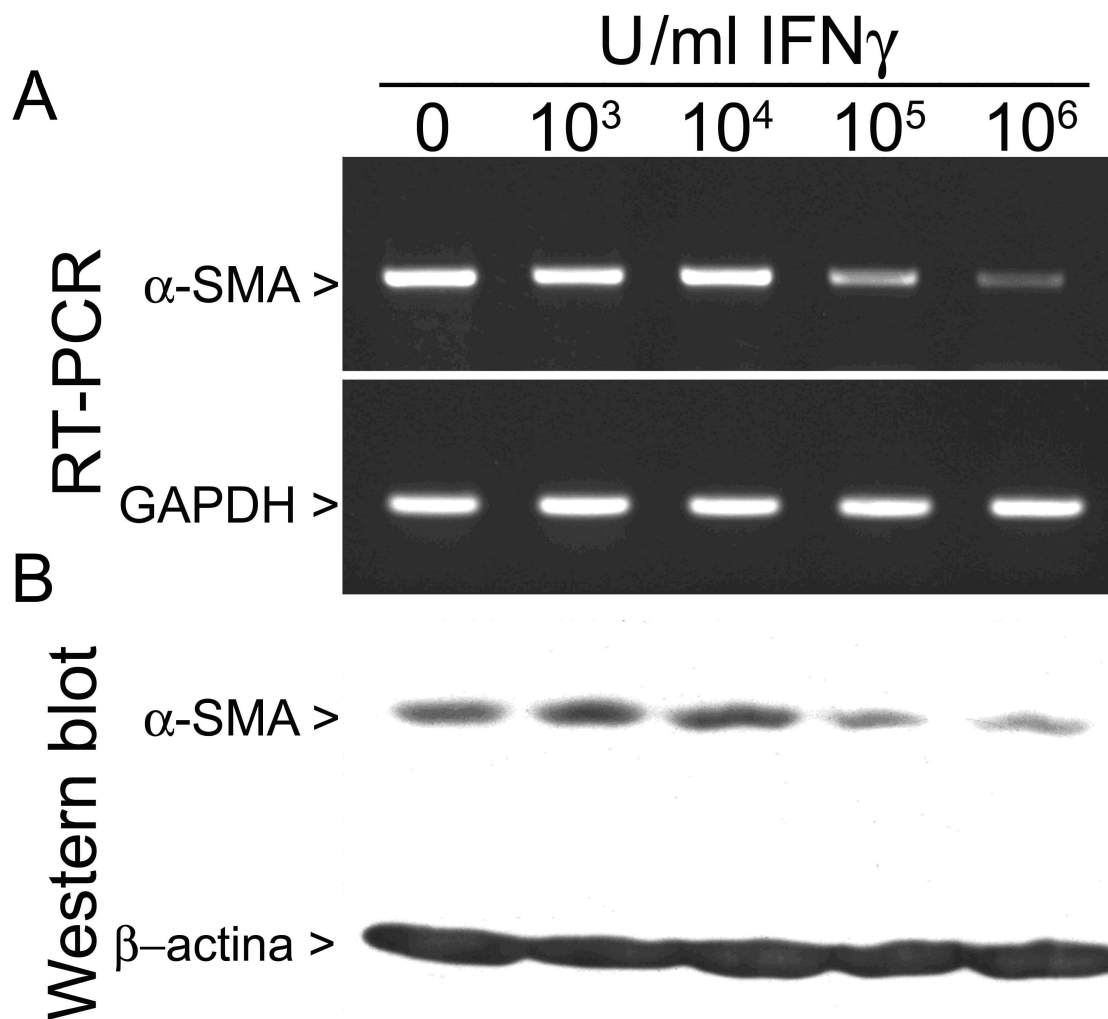


Figura 7. IFN γ inibe a expressão de α -SMA de uma maneira dose-dependente. Fibroblastos da linhagem GN1 foram mantidos sob tratamento com IFN γ nas concentrações indicadas na figura durante 3 dias. Em seguida, as células foram submetidas às extrações de RNA e proteína para análise da expressão e produção de α -SMA. **(A)** Ensaio de RT-PCR e **(B)** análise de western blot. Os níveis de expressão e produção de α -SMA foram drasticamente inibidos por IFN γ nas concentrações de 10^5 e 10^6 U/ml.

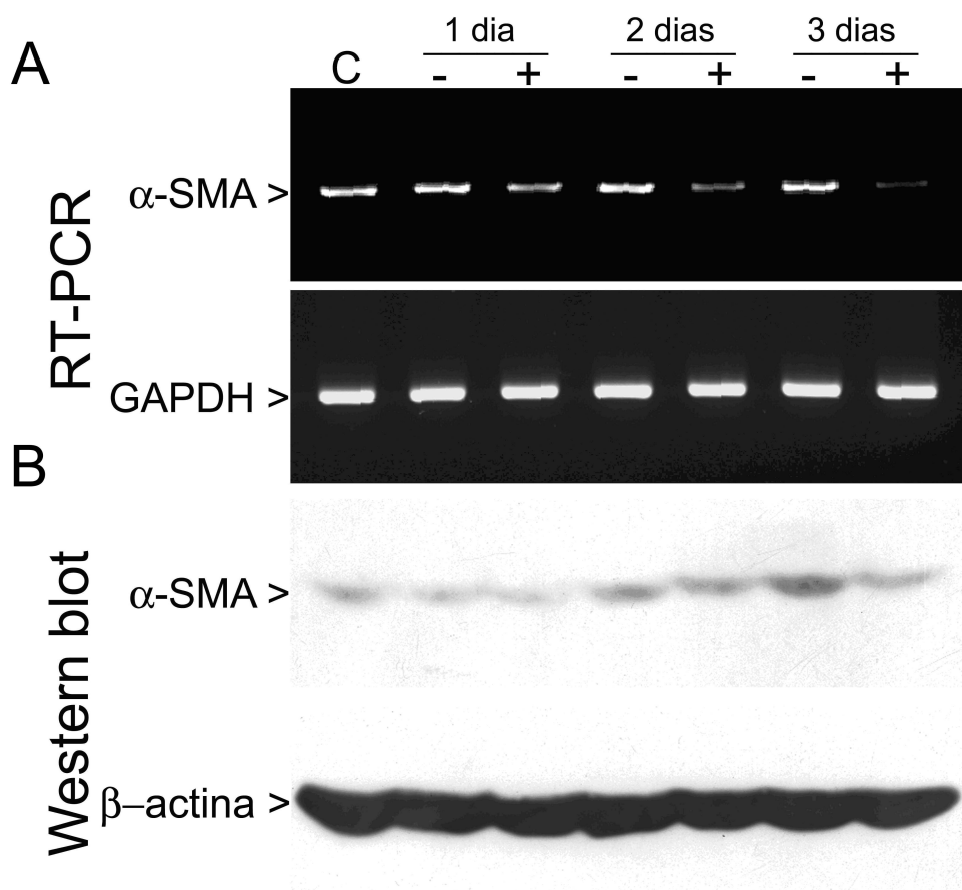


Figura 8. A inibição da expressão e produção de α -SMA por IFN γ é dependente do tempo. Fibroblastos da linhagem GN1 foram mantidos sob tratamento com IFN γ na concentração de 10^6 U/ml durante 24, 48 e 72 h. **(A)** Ensaio de RT-PCR e **(B)** análise de western blot. Os níveis de expressão do α -SMA mRNA demonstraram uma inibição gradativa, iniciando após 24 h de tratamento e com um nível de inibição máximo após 72 h de tratamento com IFN γ . Por outro lado, os níveis de produção protéica demonstraram uma queda na sua expressão apenas após 72 h de tratamento com IFN γ . Símbolo (+) representa células tratadas com IFN γ e símbolo (-) representa células controle. Canaleta indicada com a letra C representa células no tempo zero.

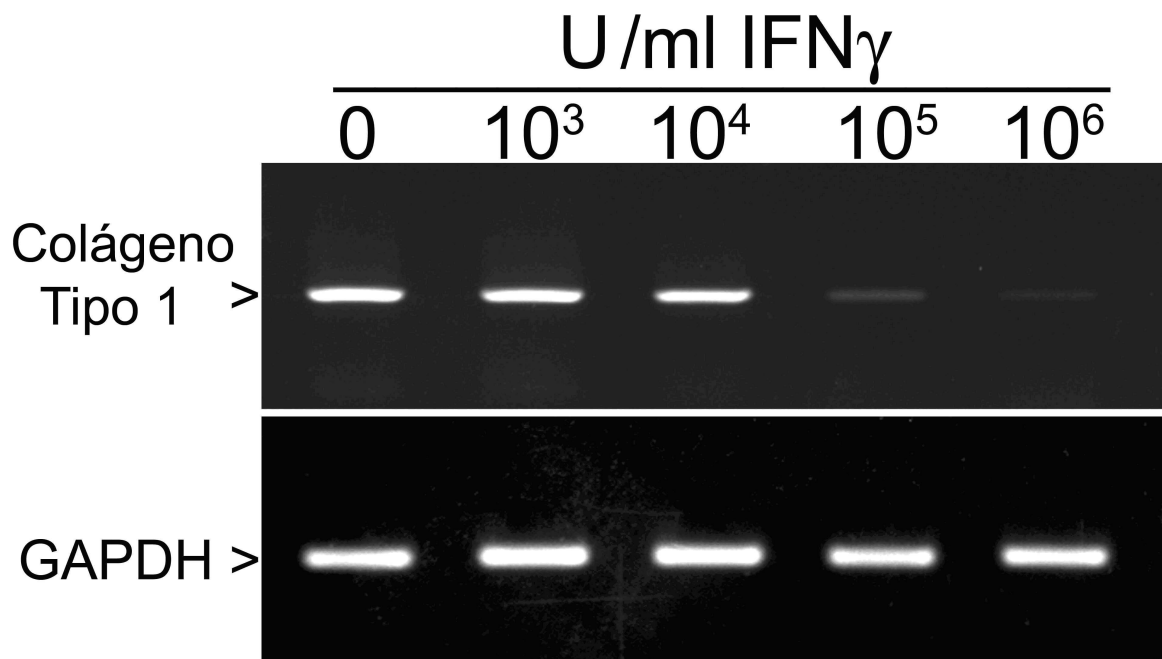


Figura 9. Análise da expressão de colágeno tipo I pelas culturas celulares da linhagem GN1 mantidas sob tratamento com IFN γ durante 3 dias. Seguindo o tratamento, as células foram coletadas e analisadas por RT-PCR. IFN γ inibiu a expressão de colágeno tipo I nas concentrações de 10⁵ e 10⁶ U/ml, demonstrando que esta citocina altera simultaneamente a expressão de α -SMA e a atividade metabólica das células.

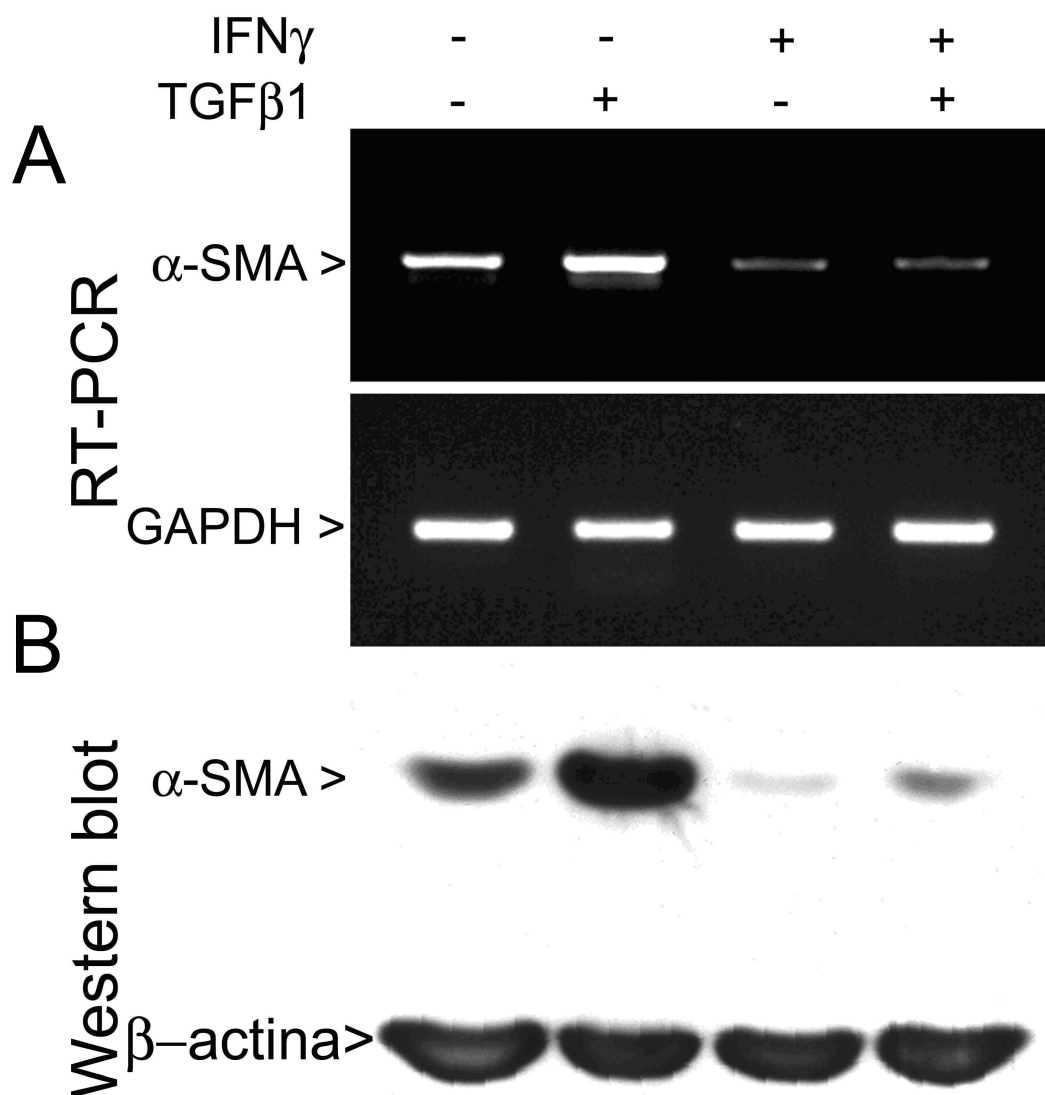


Figura 10. IFN γ inibe a transdiferenciação dos miofibroblastos induzida por TGF- β 1. Fibroblastos da linhagem GN1 foram incubados com 10 ng/ml de TGF- β 1, 10⁶ U/ml IFN γ ou concomitantemente com TGF- β 1 e IFN γ por 3 dias. Seguindo o tratamento, células foram analisadas por RT-PCR (**A**) ou western blot (**B**). IFN γ inibiu a transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos induzida por TGF- β 1.

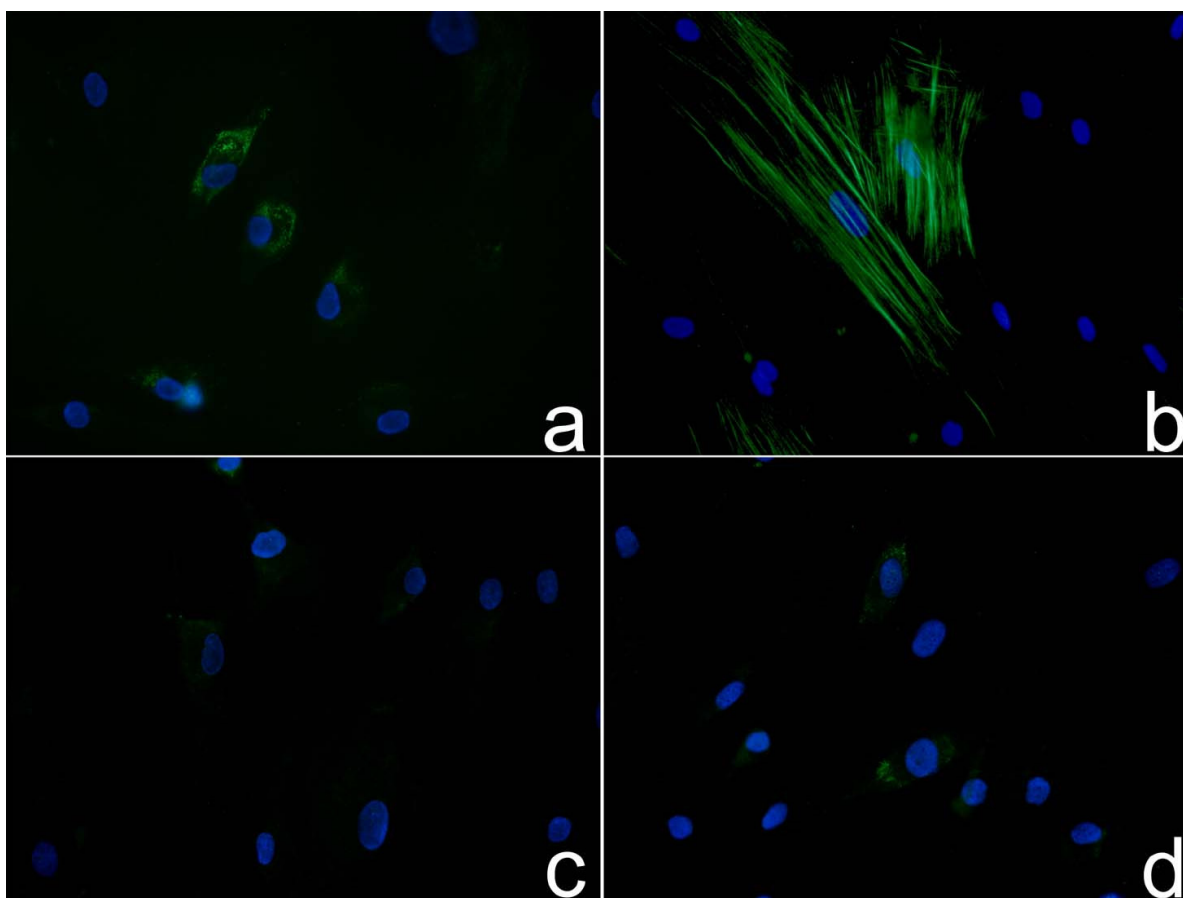


Figura 11. $\text{IFN}\gamma$ inibe a aquisição de fibras do estresse pelas células tratadas com $\text{TGF-}\beta 1$. (a) Células controle, (b) células tratadas com 10 ng/ml de $\text{TGF-}\beta 1$, (c) células tratadas com 10^6 U/ml de $\text{IFN}\gamma$ e (d) células tratadas concomitantemente com $\text{TGF-}\beta 1$ e $\text{IFN}\gamma$. $\text{IFN}\gamma$ inibiu a formação de fibras do estresse induzida por $\text{TGF-}\beta 1$.

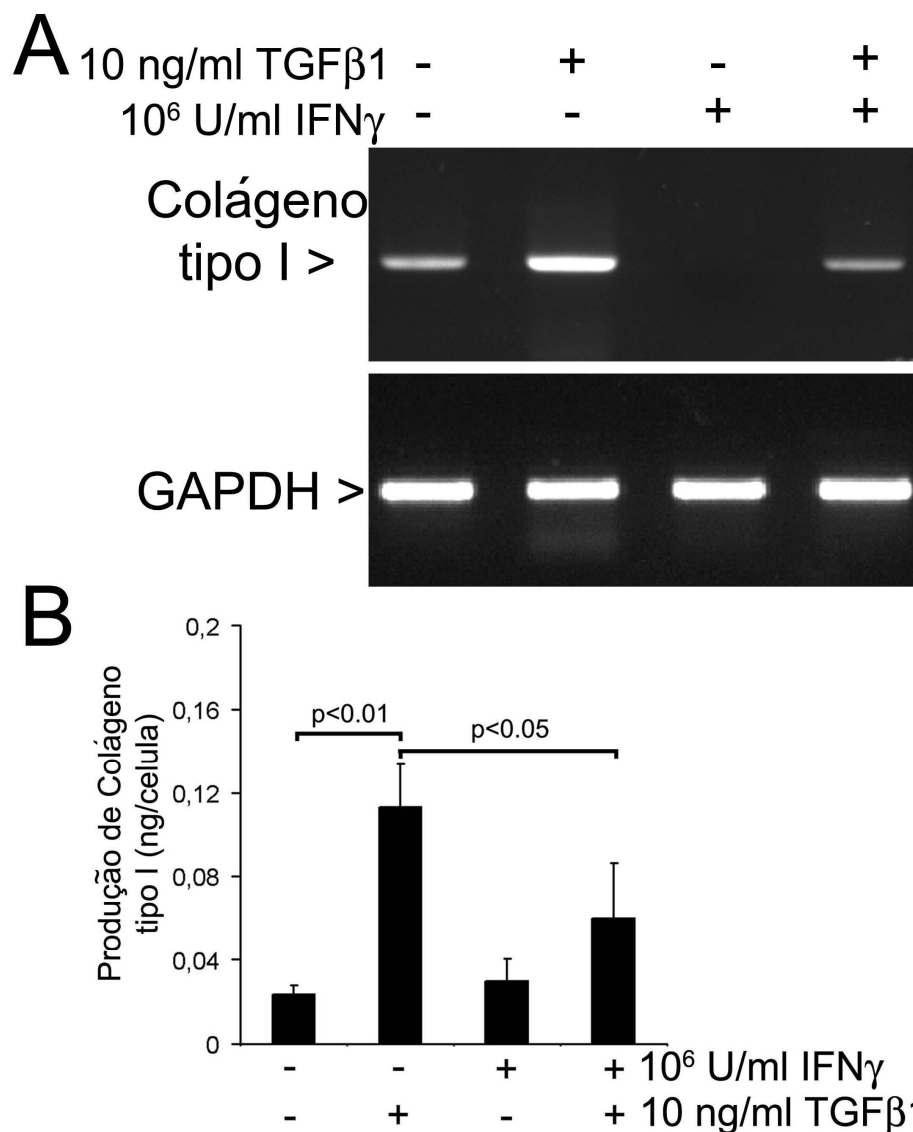


Figura 12. IFN γ significativamente inibe a expressão e produção de colágeno tipo I induzida por TGF- β 1 em culturas de GN1. **(A)** Ensaio de RT-PCR e **(B)** ELISA. Células da linhagem GN1 cultivadas com TGF- β 1 e/ou IFN γ por 3 dias foram coletadas e submetidas a extração de RNA total e análise por RT-PCR ou submetidas a extração protéica da fração ácido-solúvel e análise por ELISA. Tratamento concomitante com IFN γ inibiu a indução de TGF- β 1 na expressão e produção de colágeno tipo I.

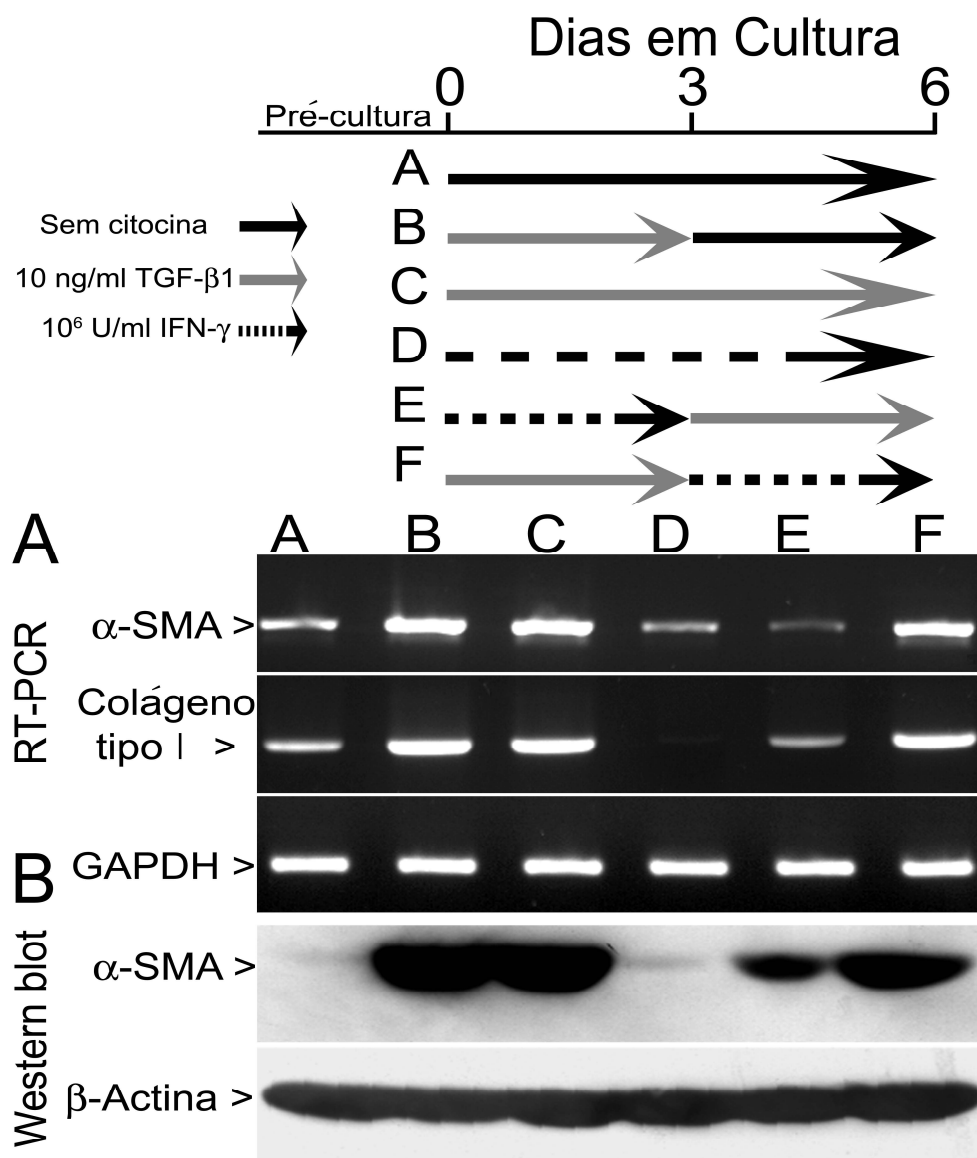


Figura 13. Tratamento prévio com IFN γ inibe a transdiferenciação dos miofibroblastos induzida por TGF- β 1. Fibroblastos da linhagem GN1 foram cultivados de acordo com os tratamentos especificados na porção superior da figura. **(A)** Ensaio de RT-PCR e **(B)** ensaio de western blot. Células tratadas previamente com IFN γ perderam a capacidade de transdiferenciar em miofibroblastos e expressar elevados níveis de colágeno tipo I quando tratadas com TGF- β 1. Por outro lado, células tratadas previamente com TGF- β 1 e posteriormente com IFN γ apresentaram uma sutil inibição na expressão de α -SMA e colágeno tipo I.

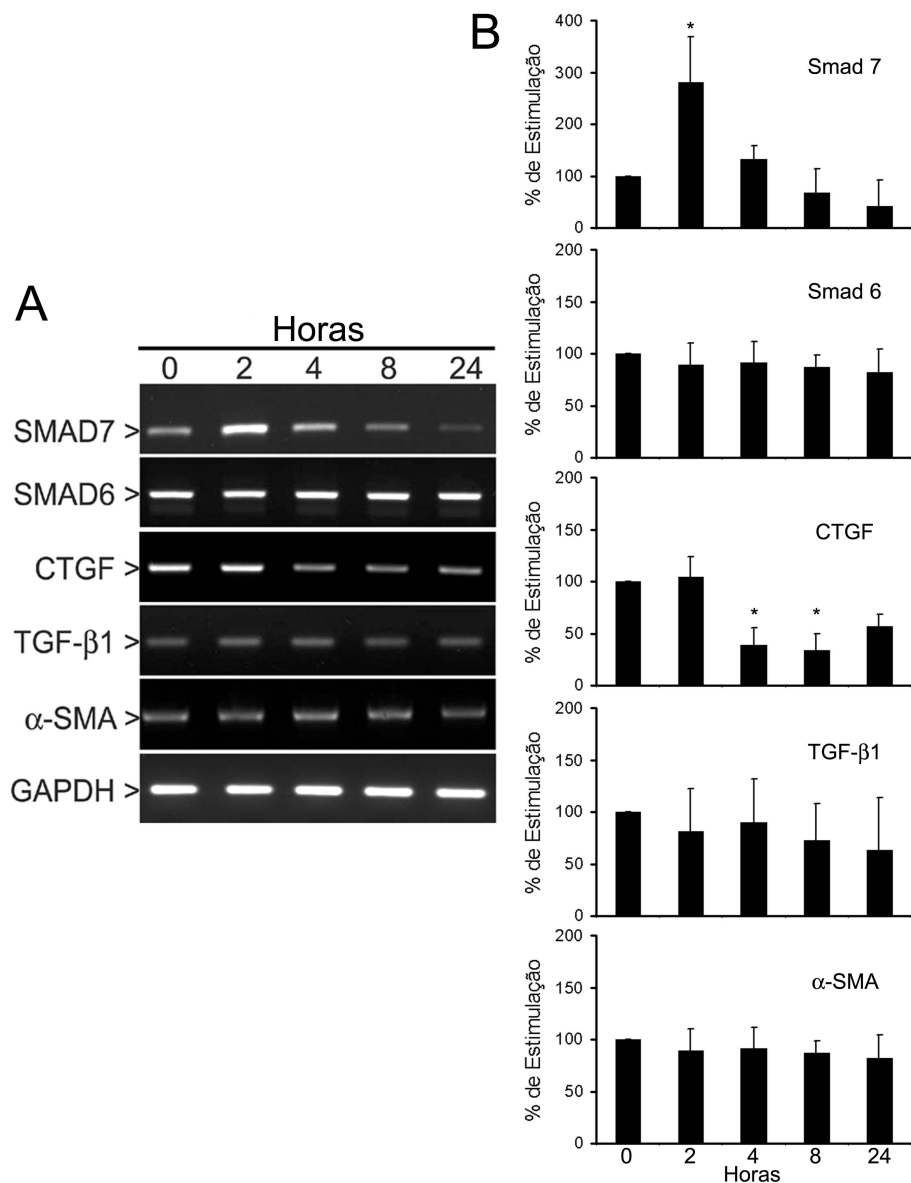


Figura 14. IFN γ significativamente estimula a expressão de Smad 7 e inibe a expressão de CTGF. Fibroblastos da linhagem GN1 submetidos ao tratamento com IFN γ foram coletados em vários períodos de tempo e analisados por RT-PCR. IFN γ estimulou significativamente a expressão de Smad 7, o que precedeu a inibição de CTGF. O tratamento com IFN γ não alterou significativamente a expressão de Smad 6, TGF- β 1 e α -SMA. *p<0,05

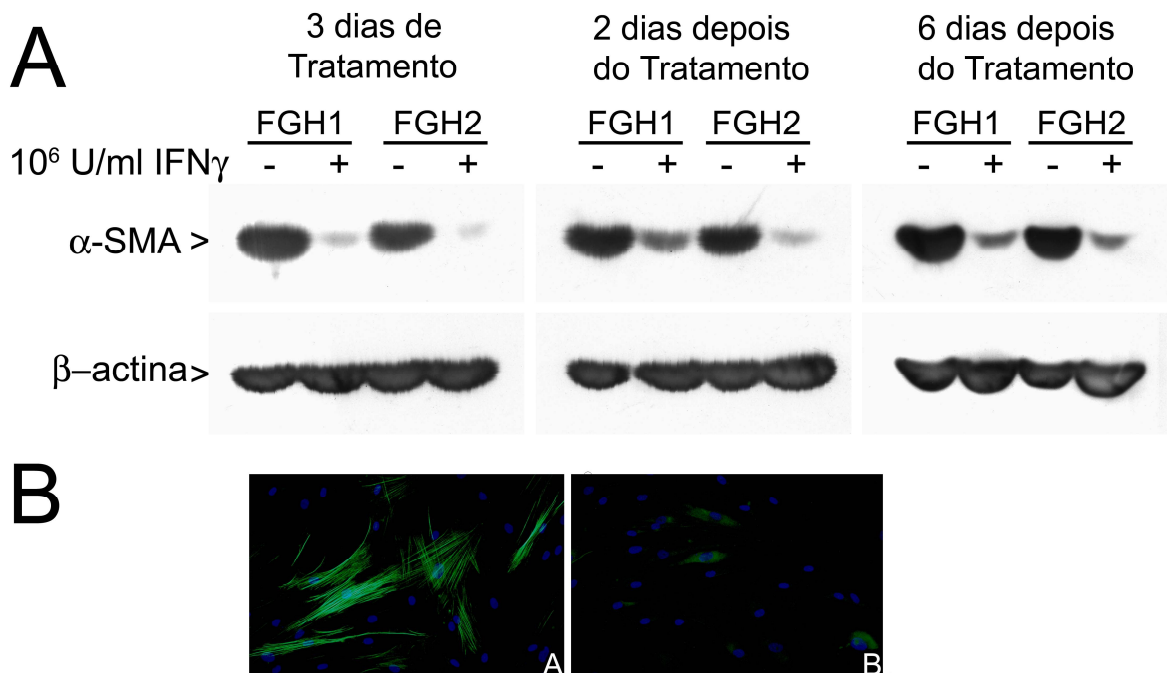


Figura 15. IFN γ reverte o fenótipo miofibroblástico das células de FGH. Linhagens de miofibroblastos derivadas de pacientes portadores de FGH foram cultivadas com IFN γ durante 3 dias. **(A)** Análise por western blot demonstrou que a produção de α -SMA foi intensamente inibida por IFN γ após 3 dias de tratamento, e que os níveis de α -SMA permaneceram inibidos mesmo 6 dias após o tratamento. **(B)** Ensaio de imunofluorescência confirmou que IFN γ inibe a produção de α -SMA, como revelado pela ausência da marcação estriada positiva no citoplasma das células tratadas com IFN γ . (a) células controle e (b) células tratadas com 10^6 U/ml de IFN γ .

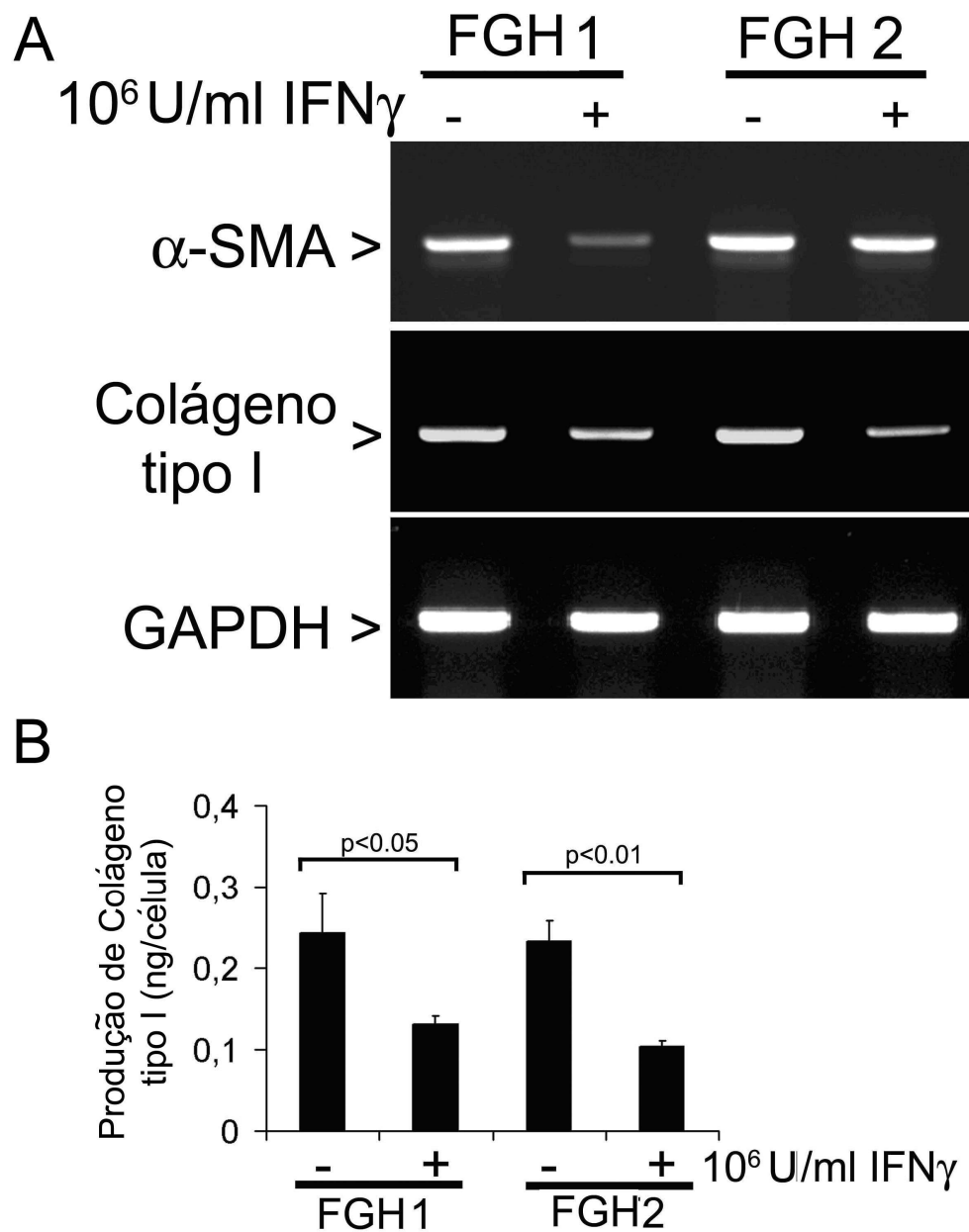


Figura 16. IFN γ inibe o metabolismo das células de FGH. Miofibroblastos mantidos por 3 dias sob tratamento com 10^6 U/ml de IFN γ foram coletados e submetidos aos ensaios de RT-PCR (**A**) e ELISA (**B**) para colágeno tipo I. Como pode ser observado, IFN γ inibiu a expressão de α -SMA que foi acompanhada por uma significativa inibição na expressão e produção de colágeno tipo I.

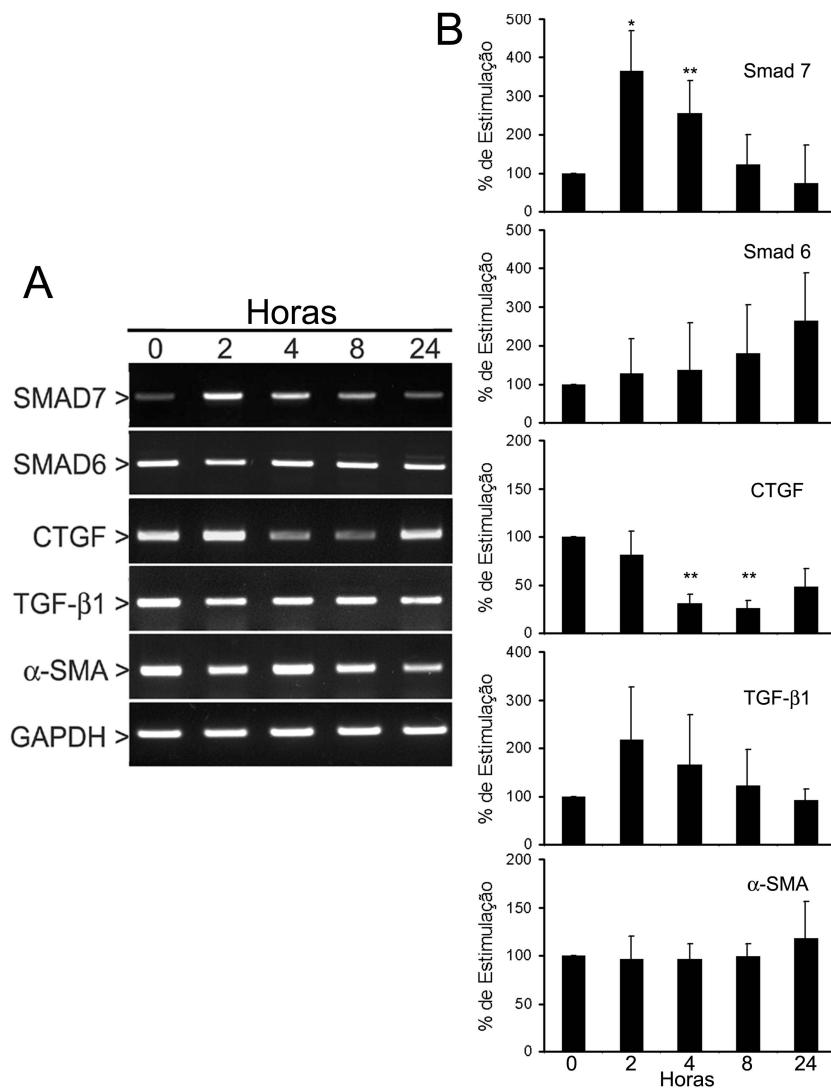


Figura 17. IFN γ reverte o fenótipo miofibroblástico das células de FGH através do estímulo da expressão de Smad 7. Miofibroblastos tratados com IFN γ demonstraram um aumento significativo na expressão de Smad 7, mas não de Smad 6. A expressão de TGF- β 1 não foi alterada, mas o aumento de Smad 7 foi acompanhado de uma inibição de CTGF, sugerindo uma inibição da atividade de TGF- β 1. Os níveis de α -SMA não foram alterados, pois o período de tratamento foi muito curto.

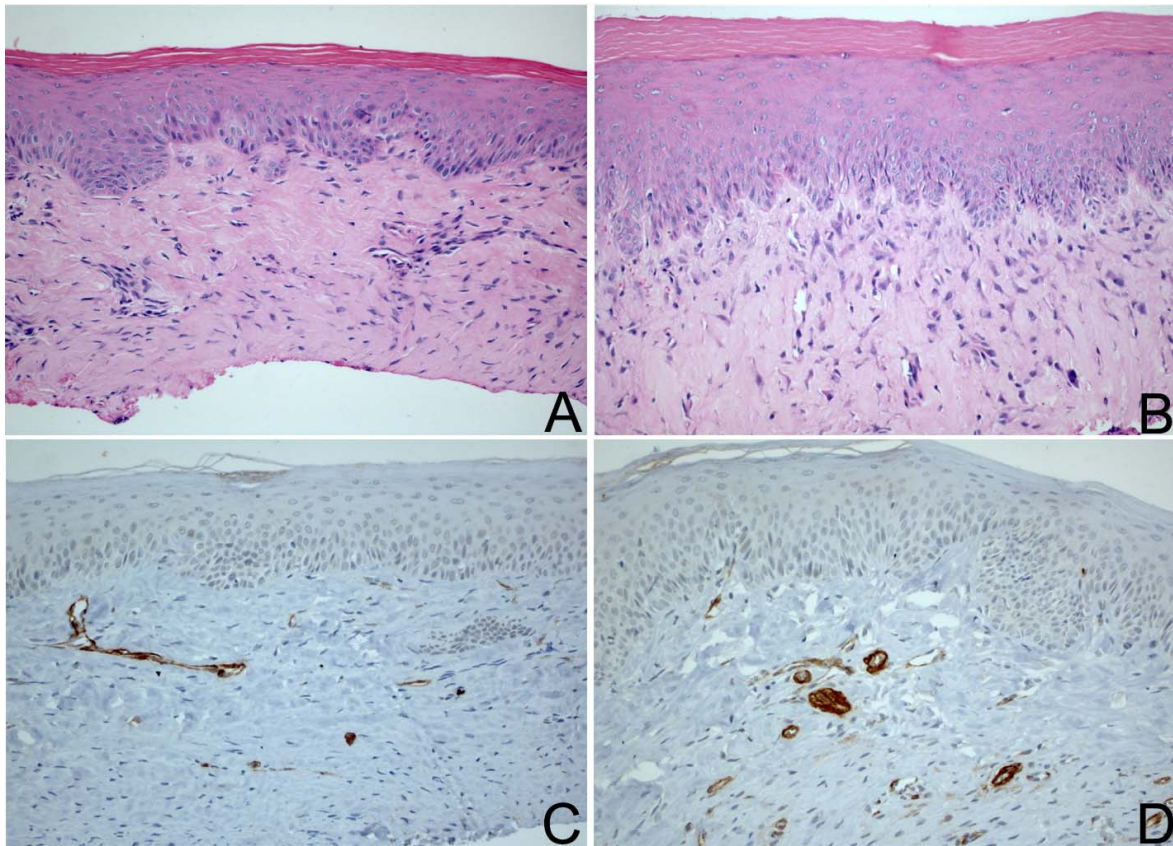


Figura 18. Aspecto histopatológico e imunohistoquímico de α -SMA nos aumentos gengivais de ratos. Fotomicrografias representativas dos grupos controle (**A e C**) e tratado com CsA (**B e D**). Em B, pode-se observar uma hiperplasia epitelial com hiperparaqueratose e aumento das criptas epiteliais adentrando o tecido conjuntivo subjacente, que se apresenta fibroso, denso e bem vascularizado. Dez amostras do grupo controle e dez do grupo tratado foram submetidas à análise imunohistoquímica utilizando anticorpos anti- α -SMA e o sistema de amplificação e revelação biotina-estreptavina-peroxidase. Todas as amostras foram negativas para a expressão de α -SMA, com exceção da parede dos vasos sanguíneos. (x200).

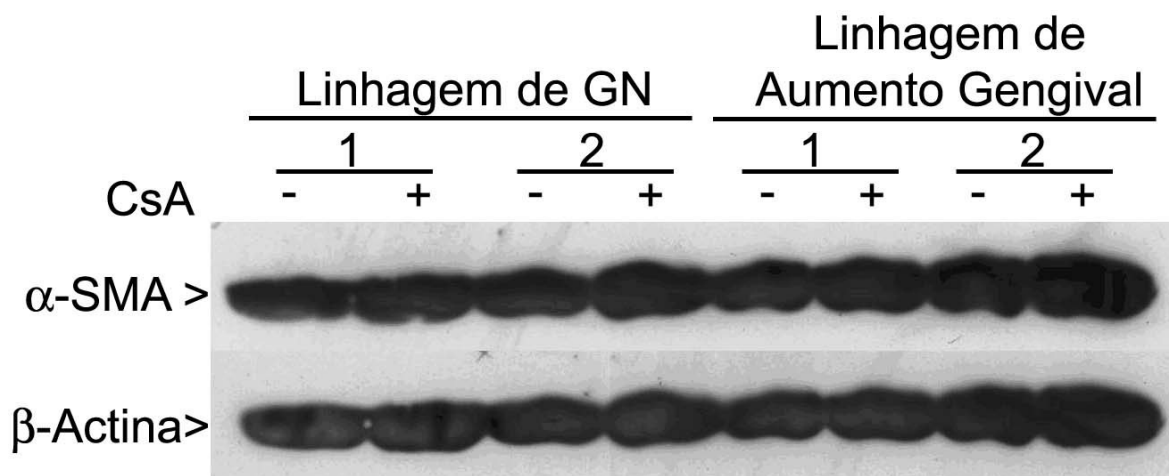


Figura 19. CsA não estimula a transdiferenciação dos miofibroblastos em culturas celulares derivadas de aumentos gengivais de ratos. Duas linhagens celulares de tecido gengival normal e 2 linhagens de aumento gengival de rato induzido por CsA foram estabelecidas. Cada linhagem passou por um tratamento com CsA à 200 ng/ml em meio de cultura contendo 0,1% de FBS, sendo que para cada linhagem foi mantido um controle sem tratamento. Foram então realizados extratos protéicos de cada amostra para a análise por western blot. CsA não estimulou a produção de α -SMA nos aumentos gengivais de ratos, mesmo quando estimulados com a droga em cultura.

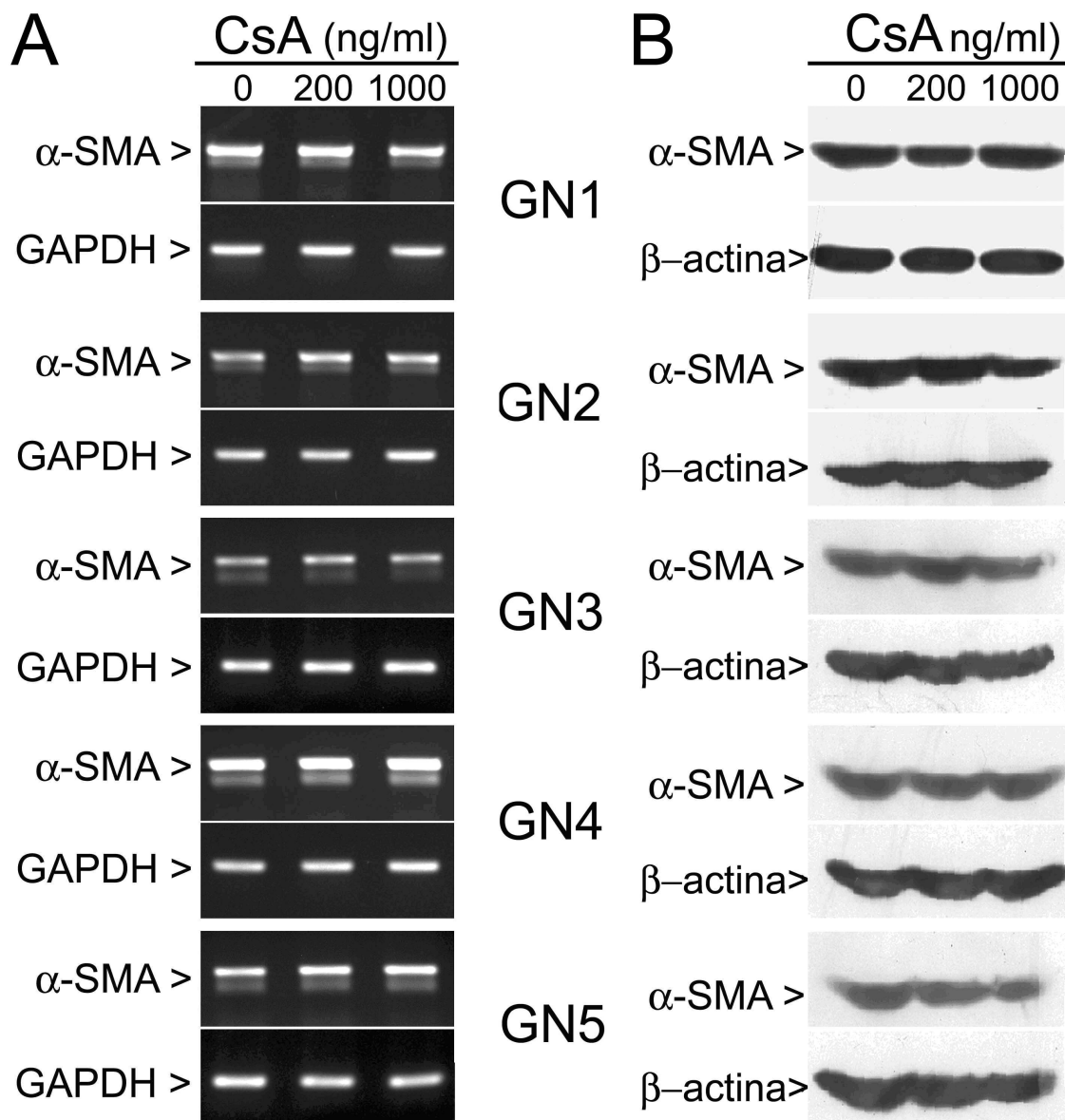


Figura 20. CsA não induz a expressão e produção de α -SMA em culturas de fibroblastos de GN. Fibroblastos foram incubados com 200 ou 1000 ng/ml de CsA em meio de cultura contendo 0,1% de FBS e cultivadas por 5 dias. No terceiro dia de cultura, o meio foi trocado por meio da mesma composição. Transcorrido os 5 dias de cultivo, a expressão e produção de α -SMA foram analisadas por RT-PCR (A) e western blot (B).

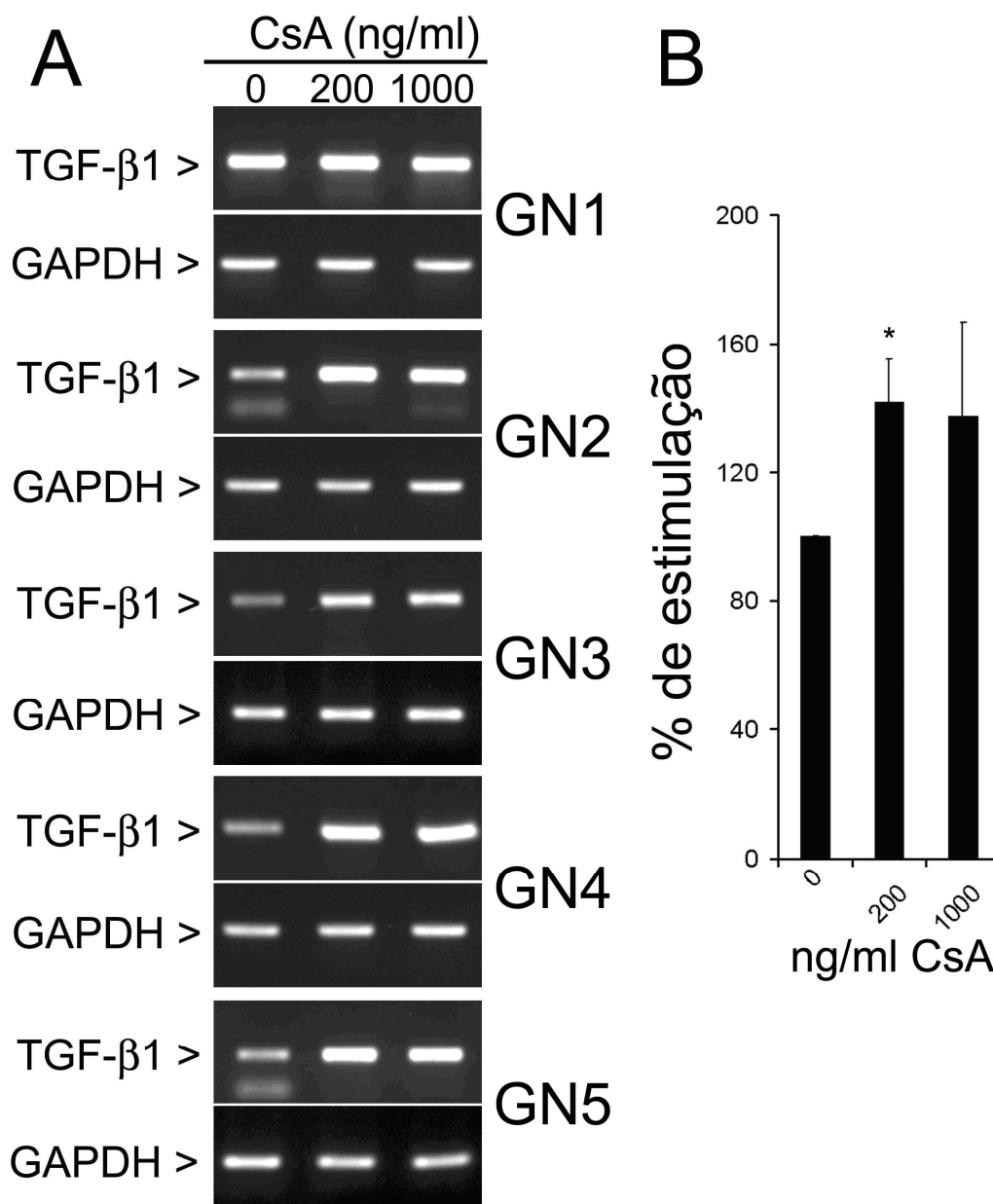


Figura 21. CsA induz a expressão de TGF- β 1 em culturas primárias de fibroblastos de GN. **(A)** Ensaio de RT-PCR e **(B)** análise densitométrica. Embora CsA não tenha induzido a transdiferenciação dos miofibroblastos, a droga estimulou significativamente a expressão de TGF- β 1 na concentração de 200 ng/ml. * $p < 0,05$

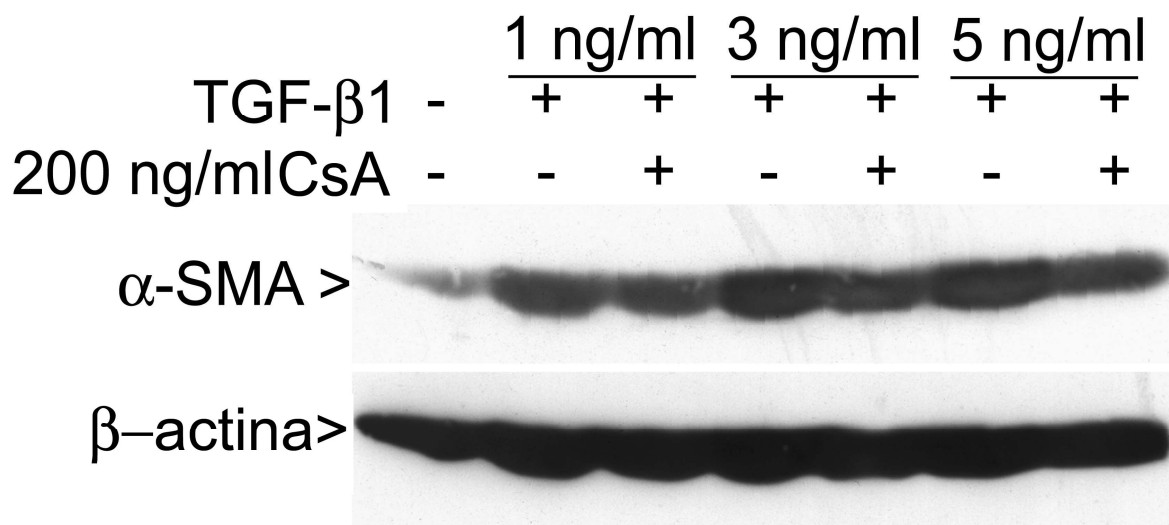


Figura 22. Efeito do tratamento concomitante de CsA e TGF- β 1 na transdiferenciação dos miofibroblastos. Fibroblastos da linhagem GN1 foram incubados simultaneamente com 200 ng/ml de CsA e 1, 3 ou 5 ng/ml de TGF- β 1 por 3 dias, seguido por análise de western blot. CsA não adicionou nenhum efeito a TGF- β 1 na indução da transdiferenciação dos fibroblastos gengivias em miofibroblastos.

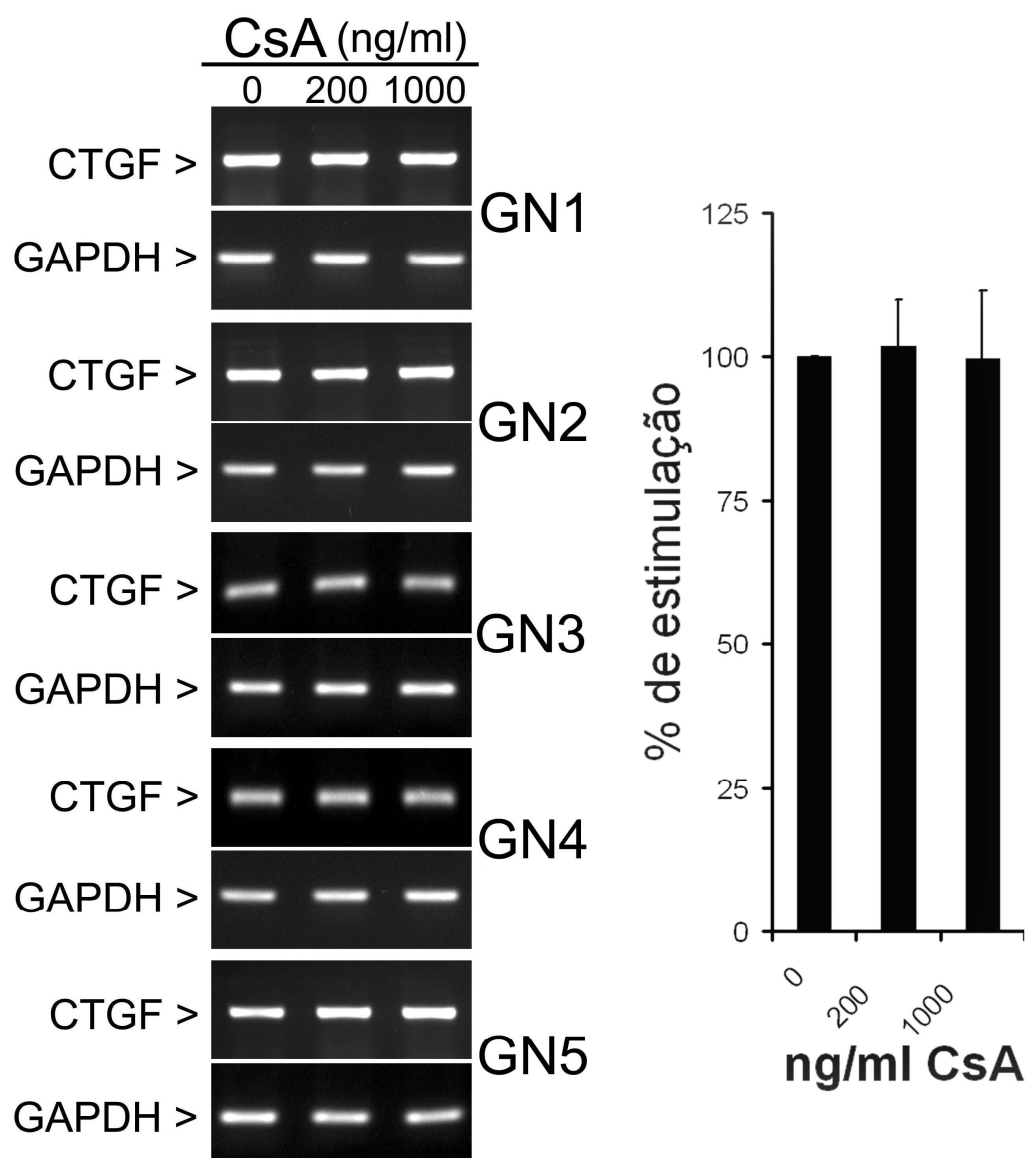


Figura 23. Efeito de CsA na expressão de CTGF. Fibroblastos gengivais foram incubados com CsA e o efeito da droga na expressão de CTGF foi analisado por RT-PCR. Como revelado CsA não induz a expressão de CTGF.

6. Discussão

A importância dos miofibroblastos para os processos de reparo tecidual é amplamente reconhecida. Estas células são responsáveis pela restauração do tecido conjuntivo através da produção de MEC e pela contração e fechamento da ferida (Hinz & Gabbiani, 2003). Miofibroblastos são transientes durante o reparo tecidual, entrando em apoptose após o término deste processo (Gabbiani, 2003). Contudo, quando persistem ou são formados em grandes quantidades, miofibroblastos induzem a formação de quelóides devido à produção excessiva de colágeno (Tomasek *et al.*, 2002). A presença dos miofibroblastos é também associada a inúmeras outras desordens fibróticas, incluindo esclerose múltipla (Carulli *et al.*, 2005), doença de Dupuytren (Tomasek *et al.*, 2002) e fibroses derivadas do rim (Yang & Lyu, 2001; Slattey *et al.*, 2005), pulmão (Ramos *et al.*, 2000; Phan, 2002; Willis *et al.*, 2006), pâncreas (Vaquero *et al.*, 2005) e fígado (Desmouliere *et al.*, 2003). Recentemente, nós demonstramos que miofibroblastos estão associados aos aumentos gengivais de pacientes com FGH, no qual as células produzem simultaneamente níveis elevados de TGF- β 1 e CTGF (Bitu *et al.*, 2006).

Miofibroblastos surgem da diferenciação de células indiferenciadas ou da transdiferenciação (transformação) de células já diferenciadas, incluindo células musculares lisas, pericitos e fibroblastos (Tomasek *et al.*, 2002). Os mecanismos de indução da transdiferenciação dos miofibroblastos vêm sendo amplamente analisados, visto que a identificação dos elementos que regulam este processo é de considerável importância para o entendimento dos mecanismos que resultam em doenças de origem fibrosa. Recentes estudos demonstraram que TGF- β 1 é um importante indutor da transdiferenciação dos miofibroblastos (Desmouliere *et al.*, 1993; Fan *et al.*, 1999; Petrov *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2003; Malmström *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006). Os resultados deste estudo claramente demonstraram que TGF- β 1 é capaz de induzir a transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos metabolicamente ativos, sendo este processo dependente da dose e do tempo de tratamento com TGF- β 1.

Fibroblastos gengivais tratados com 10 ng/ml de TGF- β 1 por 72 h apresentaram características típicas de miofibroblastos, incluindo a aquisição de uma morfologia estrelada e um significativo aumento na expressão e produção de α -SMA e colágeno tipo I. Interessantemente, nós demonstramos que existe uma concentração mínima de TGF- β 1 que necessita ser alcançada para a completa diferenciação dos miofibroblastos. Esta observação foi ilustrada pelo fato que fibroblastos gengivais tratados com 1 ng/ml de TGF- β 1 apresentaram um leve aumento nos níveis de expressão e produção de α -SMA, mas falharam em demonstrar uma completa diferenciação morfológica. Este estudo também demonstrou que miofibroblastos gerados pelo tratamento com TGF- β 1 mantém as características morfológicas e a expressão elevada de α -SMA, pelo menos, por 3 dias após a remoção de TGF- β 1. Adicionalmente, a análise por citometria de fluxo revelou que a grande maioria (mais de 90%) das células foram responsivas ao tratamento com 10 ng/ml de TGF- β 1 e que esta resposta foi relativamente uniforme, como revelado pela distribuição estreita do pico correspondendo as células tratadas com TGF- β 1.

Similarmente, alguns poucos estudos envolvendo linhagens celulares de diferentes tecidos demonstraram que TGF- β 1 induz a transdiferenciação dos miofibroblastos. Evans *et al.* (2003) demonstraram que fibroblastos pulmonares humanos submetidos ao tratamento com concentrações mínimas de TGF- β 1 se transdiferenciaram em miofibroblastos. Petrov *et al.* (2001) demonstraram que TGF- β 1 foi capaz de induzir a produção de α -SMA e colágeno por fibroblastos cardíacos de ratos, induzindo portanto a transdiferenciação. Recentemente, Smith *et al.* (2006) demonstraram que TGF- β 1 induz a transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos e sugeriram que este evento é dependente das vias de sinalização celular RhoA-ROCK e proteína quinase c-Jun N-terminal. Interessantemente, alguns estudos demonstraram que TGF- β 1 pode induzir a transdiferenciação de células epiteliais em miofibroblastos. Fan *et al.* (1999), trabalhando com células epiteliais tubulares renais de ratos, e Yao *et al.* (2004), que utilizou células epiteliais de alvéolos pulmonares, demonstraram que

TGF- β 1 é capaz de ocasionar a transformação das culturas celulares em miofibroblastos. Kasai *et al.*, 2005 demonstraram que culturas de células epiteliais pulmonares adquirem aspectos de células mesenquimais (transição epitélio-mesenquima) após serem submetidas ao tratamento com TGF- β 1. Alguns dos estudos descritos a cima também demonstraram a transdiferenciação de miofibroblastos biologicamente ativos, como revelado pelo aumento na síntese de colágeno (Evans *et al.*, 2003; Kasai *et al.*, 2005).

Em paralelo a transdiferenciação dos miofibroblastos induzida por TGF- β 1, a expressão de CTGF foi estimulada. Na verdade, TGF- β 1 induziu a expressão de CTGF em uma dose menor e em um período precoce à expressão de α -SMA. Embora estes resultados sejam sugestivos da participação de CTGF na transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos induzida por TGF- β 1, eles não são conclusivos. Para confirmar a importância de CTGF neste processo, nós reduzimos os níveis de expressão de CTGF em fibroblastos gengivais sob tratamento com TGF- β 1, com a técnica de RNA de interferência. Esta técnica tem demonstrado ser a mais específica e eficaz na inibição da expressão gênica, sendo uma ferramenta notável para a análise das funções de um gene (Kurreck, 2006.). Embora ainda em fase experimental, uma aplicação terapêutica também tem sido dada a esta técnica (Bumcrot *et al.*, 2006). O tratamento de fibroblastos gengivais com seqüências específicas que reconhecem o mRNA de CTGF e estimulam sua degradação pelo complexo RISC reduziu significativamente a expressão de CTGF comparado com células tratadas com seqüências não-específicas (dado não demonstrado). Interessantemente, em células transfectadas com as seqüências de siRNA CTGF e, posteriormente, tratadas com TGF- β 1, a transdiferenciação dos miofibroblastos não foi alcançada, como revelado pela não indução na expressão de α -SMA. Por outro lado, fibroblastos gengivais transfectados com as seqüências não-específicas de siRNA e tratados com TGF- β 1 sofreram a transdiferenciação para miofibroblastos. Coletivamente, estes resultados claramente demonstram que a indução da

transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos por TGF- β 1 é dependente de CTGF.

A dependência de CTGF na indução da transdiferenciação dos miofibroblastos por TGF- β 1 foi previamente demonstrada. Yokoi *et al.* (2001) foram os primeiros a demonstrar que TGF- β 1 depende de CTGF para induzir a transdiferenciação dos miofibroblastos. Estes autores trataram fibroblastos renais normais de rato com TGF- β 1 e observaram uma indução na expressão de α -SMA. Contudo, o mesmo tratamento associado a oligonucleotídeos antisense, que reconheciam a seqüência inicial da tradução das moléculas de mRNA para CTGF, não induziu a expressão de α -SMA. Utilizando fibroblastos da córnea humana, Garrett *et al.* (2004) obtiveram resultados similares a Yokoi *et al.* (2002). Estes autores demonstraram que o silenciamento gênico através de oligonucleotídeos antisense contra CTGF previne a indução da transdiferenciação dos miofibroblastos promovida por TGF- β 1. Zhang *et al.* (2004) demonstraram que a adição de CTGF exógeno a culturas de células epiteliais tubulares renais induziu a transdiferenciação dos miofibroblastos, e que oligonucleotídeos antisense contra CTGF aboliu este evento. Interessantemente, Grotendorst & Duncan (2005) demonstraram que CTGF apresenta 2 domínios com funções distintas sobre fibroblastos renais de ratos. Enquanto a porção C-terminal induz a proliferação dos fibroblastos, a porção N-terminal induz a transdiferenciação em miofibroblastos. A significância e o completo entendimento destes achados necessitam ainda de esclarecimentos adicionais. Um recente estudo por Forino *et al.* (2006) demonstraram que TGF- β 1 induziu significativamente a transição de células epiteliais renais humanas em células mesenquimais (transição epitélio-mesênquima), o qual foi acompanhado por uma estimulação na expressão de CTGF. Contudo, estas células mesenquimais falharam em expressar α -SMA, sugerindo que a transdiferenciação dos miofibroblastos não foi alcançada.

A neutralização da síntese ou da sinalização de TGF- β 1 com anticorpos neutralizantes, tecnologias antisense ou drogas antagonistas tem demonstrado resultados satisfatórios no tratamento de modelos animais de doenças fibrosas

(para revisão ver Gressner *et al.*, 2002). Contudo, onde o bloqueio de TGF- β 1 interfere com a geração e/ou atividade dos miofibroblastos é ainda incerto. Drogas que interferem com miofibroblastos podem ser extremamente úteis no tratamento de doenças caracterizadas por fibroses intersticiais, como a FGH. Durante o estudo de Bitu *et al.* (2006), nós observamos que os tecidos gengivais contendo áreas onde a resposta inflamatória se encontrava exacerbada apresentavam uma significativa redução no número de miofibroblastos, sugerindo que produtos derivados das células inflamatórias poderiam estar bloqueando o fenótipo miofibroblástico das células. Na tentativa de verificar o efeito de algumas citocinas inflamatórias na transdiferenciação dos miofibroblastos, nós adicionamos as culturas de fibroblastos gengivais concentrações crescentes de IL-6, IL-1 β e IFN γ , e analisamos a expressão de α -SMA (dado não demonstrado). IFN γ foi o único fator capaz de inibir a expressão de α -SMA. Estudando em maiores detalhes, nós demonstramos que IFN γ inibiu significativamente a expressão de α -SMA em uma maneira dependente da dose e do tempo de tratamento. Em associação a inibição de α -SMA, IFN γ também inibiu a expressão e produção de colágeno tipo I. IFN γ bloqueou o efeito de TGF- β 1 na geração dos miofibroblastos e significativamente inibiu o metabolismo dos miofibroblastos derivados de pacientes com FGH, como revelado pela diminuição na expressão e produção de α -SMA e colágeno tipo I.

Resultados semelhantes aos nossos foram previamente descritos. O tratamento de culturas celulares de miofibroblastos derivadas de quelóides com IFN γ inibiu a produção de α -SMA e MEC, resultando em uma menor força contrátil das culturas em géis tridimensionais de colágeno (Hasegawa *et al.*, 2003). Gu *et al.* (2004) analisaram os efeitos de IFN γ e dexametasona na indução da transdiferenciação dos fibroblastos fetais de pulmão humano em miofibroblastos por TGF- β 1. Estes autores demonstraram que IFN γ previne a indução da transdiferenciação dos miofibroblastos promovida por TGF- β 1, enquanto dexametasona potencializa este efeito quando adicionado simultaneamente com TGF- β 1. A adição apenas de dexametasona não foi capaz de induzir a

transdiferenciação dos miofibroblastos. Camundongos deficientes em IFN γ (knock out, IFN $\gamma^{-/-}$) exibiram um significativo aumento no número de miofibroblastos, na produção de TGF- β 1 e na deposição de colágeno comparado com animais normais (IFN $\gamma^{+/+}$) durante o processo de reparo de feridas experimentais (Ishida *et al.*, 2004). Interessantemente, Tanaka *et al.* (2003) demonstraram que IFN γ drasticamente bloqueia a geração de miofibroblastos induzida por TGF- β 1, mas moderadamente reverte o fenótipo dos miofibroblastos isolados de pacientes com doença de Dupuytren. Em fibroblastos subconjuntivais humanos, tratamento com IFN γ reduziu a produção de MEC e preveniu a transdiferenciação dos miofibroblastos induzida por TGF- β 1, sugerindo uma aplicação terapêutica para IFN γ (Yamanaka *et al.*, 2002). A experiência terapêutica com IFN γ é limitada a 2 estudos clínicos (Larrabee *et al.*, 1997; Pittet *et al.*, 1994). Por exemplo, no estudo clínico conduzido com pacientes afetados pela doença de Dupuytren, injeções de IFN γ nas lesões nodulares do punho revelaram uma melhora clínica, que foi histologicamente acompanhada por uma significativa redução na atividade dos miofibroblastos (Pittet *et al.*, 1994). Coletivamente, estes resultados suportam que IFN γ pode ser útil para o tratamento de pacientes com FGH e estudos clínicos com aplicação local de IFN γ devem ser realizados nestes pacientes.

Os resultados deste estudo também revelaram que o bloqueio da transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos exercido por IFN γ é provavelmente mediado por uma inibição na cascata de ativação de TGF- β 1. Nós observamos que o tratamento de fibroblastos gengivais com IFN γ induziu rapidamente a expressão de Smad 7, o qual foi acompanhada por uma significativa inibição na expressão de CTGF. IFN γ não alterou os níveis de Smad 6 e TGF- β 1. Estes resultados foram reproduzidos na linhagem de miofibroblastos FGH1. Em células CT, miofibroblastos da linhagem C2C12 expressando constitutivamente níveis elevados de TGF- β 1, o tratamento com IFN γ diminuiu a produção de TGF- β 1 e, conseqüentemente, bloqueou a expressão de vimentina e α -SMA pelas células (Foster *et al.*, 2003). O estudo realizado por Ulloa *et al.*

(1999) demonstrou que IFN γ , através da cascata de ativação Jak/Stat, induziu os níveis de expressão de Smad 7. Por outro lado, Gu *et al.* (2004) demonstraram que o efeito de IFN γ na transdiferenciação dos fibroblastos fetais do pulmão humano em miofibroblastos não foi dependente da estimulação de Smad 7, de uma diminuição na fosforilação de Smad 2 ou Smad 3 e nem foi dependente da translocação de proteínas Smads para o núcleo celular. Adicionalmente, o estudo de Ghosh *et al.* (2001) demonstrou que IFN γ bloqueou a produção de colágeno tipo I induzida por TGF- β 1, em parte, por antagonizar a interação das proteínas Smad com a via de sinalização de Jak ao nível das proteínas p300/CBP. Então, novos estudos são necessários para esclarecer se os mecanismos de bloqueio de IFN γ são dependentes do tipo celular.

A descoberta da droga imunossupressora CsA liderou um grande avanço para o prognóstico dos pacientes recipientes de transplantes. Apesar dos efeitos benéficos na prevenção da rejeição do transplante, a mortalidade por doenças cardiovasculares e renais é significativamente maior em pacientes em tratamento com CsA comparado a população normal (Lucey *et al.*, 2005). Isto é uma consequência dos graves e comuns efeitos colaterais associados ao uso da droga, incluindo hipertensão, nefrotoxicidade e acúmulo de tecido conjuntivo fibroso (Rezzani, 2004). Os mecanismos que levam CsA a induzir estes e outros efeitos indesejáveis remanescem desconhecidos. O aumento gengival é um comum efeito colateral da CsA, sendo observado em aproximadamente 30% dos pacientes que fazem uso do medicamento. A principal característica do aumento gengival é o excessivo acúmulo de MEC, principalmente colágeno tipo I (Dannewitz *et al.*, 2006). Inúmeros estudos demonstraram um aumento na expressão e produção de colágeno tipo I em tecidos e culturas de fibroblastos derivadas de aumento gengivais induzidos por CsA. O presente estudo avaliou os efeitos de CsA na transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos. Os modelos *in vivo* de injeções diárias de CsA em ratos Wistar e *in vitro* de tratamento de culturas de fibroblastos gengivais com CsA foram escolhidos por mimetizar o crescimento gengival observado em humanos (Spolidoro *et al.*, 2001; Cotrim *et al.*,

2002; Cotrim *et al.*, 2003). O principal resultado deste estudo foi que CsA não induz a transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos. Adição de CsA também não foi capaz de induzir a transdiferenciação dos miofibroblastos em culturas de fibroblastos derivadas de aumentos gengivais de ratos. Como esperado, CsA estimulou significativamente a expressão de TGF- β 1 pelos fibroblastos gengivais. A hipótese levantada foi que CsA não estivesse estimulando TGF- β 1 em níveis necessários para promover a transdiferenciação dos miofibroblastos. Contudo, o tratamento concomitante de CsA e TGF- β 1 não potencializou o efeito de TGF- β 1 neste processo. Em adição, nossos resultados revelaram que CsA não induz a expressão de CTGF, sugerindo a razão pela falta de efeito de CsA na transdiferenciação dos miofibroblastos.

Em oposição aos nossos resultados, Vaquero *et al.* (1999) demonstraram o surgimento de miofibroblastos no pâncreas de ratos tratados com CsA. Estas células foram principalmente distribuídas em áreas com excessivo acúmulo de tecido conjuntivo fibroso sem infiltrado inflamatório. Similarmente, a transdiferenciação dos miofibroblastos foi induzida por CsA em rins de rato (Ahmed *et al.*, 2004). Mais recentemente, alguns estudos demonstraram que CsA induz a emergência de miofibroblastos via transição de células epiteliais (McMorrow *et al.*, 2005; Slattery *et al.*, 2005). Em adição, estes estudos demonstraram que a transdiferenciação é acompanhada por uma significativa indução na expressão de CTGF. Então, a ausência na transdiferenciação dos miofibroblastos após o tratamento de fibroblastos gengivais com CsA pode ser dependente do tecido e do tipo celular, visto que o efeito de CsA na indução da transdiferenciação dos miofibroblastos ocorreu em células epiteliais e não em fibroblastos. Adicionalmente, a elevação dos níveis de expressão de TGF- β 1 sozinho não é suficiente para induzir a transdiferenciação dos miofibroblastos, sendo CTGF requerido. Em concordância com esta observação, um estudo imunohistoquímico em tecidos de aumento gengival induzido por CsA demonstrou que CTGF não está associado a este processo (Uzel *et al.*, 2001). Estudos futuros

são necessários para determinar o exato papel da via de ativação TGF- β 1/CTGF na patogênese dos aumentos gengivais induzidos por CsA.

7. Conclusões

1. TGF- β 1 induziu a transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos em uma maneira dependente da dose e do tempo de tratamento.
2. O efeito de TGF- β 1 na transdiferenciação dos miofibroblastos foi dependente da ativação de CTGF.
3. IFN γ inibiu a expressão e produção de α -SMA em uma maneira dose- e tempo-dependente.
4. IFN γ inibiu a transdiferenciação dos miofibroblastos induzida por TGF- β 1 em culturas de fibroblastos gengivais.
5. O tratamento dos fibroblastos gengivais com IFN γ resultou na estimulação de Smad 7, com posterior inibição de CTGF.
6. IFN γ reverteu o fenótipo miofibroblástico das culturas celulares derivadas de FGH em uma via dependente da estimulação de Smad 7.
7. Os miofibroblastos não estavam associados aos aumentos gengivais induzidos por CsA em ratos Wistar.
8. CsA foi incapaz de modular os níveis de expressão de CTGF.

Referências*

Ahmed A, Huang L, Raftery AT, Ahmed AK, Fahmy H, El Nahas AM, *et al.* Cyclosporine A sensitizes the kidney to tubulointerstitial fibrosis induced by renal warm ischemia. *Transplantation*. 2004; 77(5): 686-692.

Argani H, Pourabbas R, Hassanzadeh D, Masri M, Rahravi H: Treatment of cyclosporine-induced gingival overgrowth with azithromycin-containing toothpaste. *Exp Clin Transplant*. 2006; 4(1): 420-424.

Arora PD, Silvestrini L, Ganss B, Sodek J, McCulloch CA. Mechanism of cyclosporin-induced inhibition of intracellular collagen degradation. *J Biol Chem*. 2001; 276(17): 14100-14109. Epub 2001 Jan 22.

Bandid C, Mounier N, Costa AM, Desmouliere A. Role of myofibroblasts during normal tissue repair and excessive scarring: interest of their assessment in nephropathies. *Histol Histopathol*. 2000; 15(1): 7-12.

Baroni GS, D'Ambrosio L, Curto P, Casini A, Mancini R, Jezequel AM, *et al.* Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology*. 1996; 23(5): 1189-1199.

Bartold PM: Regulation of human gingival fibroblast growth and synthetic activity by cyclosporine-A in vitro. *J Periodontal Res*. 1989; 24(5): 314-321

Bitu CC, Sobral LM, Kellermann MG, Martelli-Junior H, Zecchin KG, Graner E, *et al.* Heterogeneous presence of myofibroblasts in hereditary gingival fibromatosis. *J Clin Periodontol* 2006; 33(6):393-400.

Boltchi FE, Rees TD, Iacopino AM: Cyclosporine A-induced gingival overgrowth: a comprehensive review. Quintessence Int. 1999; 30(11): 775-783.

Bolzani G, Della Coletta R, Martelli Junior H, Martelli Junior H, Graner E: Cyclosporin A inhibits production and activity of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts. J Periodontal Res. 2000; 35(1): 51-58.

Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H: Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. Agents Actions. 1976; 6(4): 468-475.

Bostrom A, Bharath H, Saulewicz A, Narayanan AS: Cyclosporin a affects signaling events differentially in human gingival fibroblasts. J Dent Res. 2005; 84(6): 532-536.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1972; 72(7): 248-254.

Bumcrot D, Manoharan M, Koteliansky V, Sah DW. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. Nat Chem Biol. 2006; 2(12):711-719.

Campistol JM, Inigo P, Larios S, Bescos M, Oppenheimer F: Role of transforming growth factor-beta1 in the progression of chronic allograft nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 2001; 16 Suppl 1:114-116.

Carulli MT, Ong VH, Ponticos M, Shiwen X, Abraham DJ, Black CM, *et al.* Chemokine receptor CCR2 expression by systemic sclerosis fibroblasts: evidence for autocrine regulation of myofibroblast differentiation. Arthritis Rheum. 2005; 52(12): 3772-3782.

Chae HJ, Ha MS, Yun DH, Pae HO, Chung HT, Chae SW, Jung YK, Kim HR: Mechanism of Cyclosporine-induced Overgrowth in Gingiva. J Dent Res. 2006; 85(6): 515-519.

Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenics proteins. Growth Factors. 2004; 22(4): 233-241.

Chen Y, Blom IE, Sa S, Goldschmeding R, Abraham DJ, Leask A: CTGF expression in mesangial cells: involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC. Kidney Int 2002; 62(4): 1149-1159.

Chen YT, Tu HP, Chin YT, Shen EC, Chiang CY, Gau CH, Fu E: Upregulation of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor gene and protein expression in cyclosporin-induced overgrown edentulous gingiva in rats. J Periodontol. 2005; 76(12): 2267-2275.

Chomezynshi P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-159.

Ciavarella D, Guiglia R, Campisi G, Di Cosola M, Di Liberto C, Sabatucci A, *et al.* Update on gingival overgrowth by cyclosporine A in renal transplants. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2007; 12(1): E19-25.

Coletta RD, Reynolds MA, Martelli-Junior H, Graner E, Almeida OP, Sauk JJ: Testosterone stimulates proliferation and inhibits interleukin-6 production of normal and hereditary gingival fibromatosis fibroblasts. Oral Microbiol Immunol. 2002; 17(3): 186-192.

Colwell AS, Krummel TM, Longaker MT, Lorenz HP: Fetal and adult fibroblasts have similar TGF-beta-mediated, Smad-dependent signaling pathways. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117(7):2277-2283

Cornelissen AM, Maltha JC, Von den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM. Local injection of IFN-gamma reduces the number of myofibroblasts and the collagen content in palatal wounds. *J Dent Res*, 2000; 79(10): 1782-1788.

Cotrim P, de Andrade CR, Martelli-Junior H, Graner E, Sauk JJ, Coletta RD: Expression of matrix metalloproteinases in cyclosporin-treated gingival fibroblasts is regulated by transforming growth factor (TGF)-beta1 autocrine stimulation. *J Periodontol* 2002; 73(11):1313-1322.

Cotrim P, Martelli-Junior H, Graner E, Sauk JJ, Coletta RD: Cyclosporin A induces proliferation in human gingival fibroblasts via induction of transforming growth factor-beta1. *J Periodontol*. 2003; 74(11):1625-1633.

Dannewitz B, Edrich C, Tomakidi P, Kohl A, Gabbert O, Eickholz P, Steinberg T: Elevated gene expression of MMP-1, MMP-10, and TIMP-1 reveal changes of molecules involved in turn-over of extracellular matrix in cyclosporine-induced gingival overgrowth. *Cell Tissue Res*. 2006; 325(3): 513-522.

Derynck R, Zhang YE: Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003; 425(6958):577-584.

Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblasts. *Wound Repair Regen*. 2005, 13(1):7-12.

Desmouliere A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblasts, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest.* 2003; 33(6): 393-400.

Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993; 122(1): 103-111.

Dongari-Bagtzoglou A: Drug-associated gingival enlargement. *J Periodontol* 2004; 75(10):1424-1431.

Dosanjh A: Connective tissue growth factor expression in human bronchial epithelial cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2006; 38(1): 53-57.

Evans RA, Tian YC, Steadman R, Phillips AO: TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins. *Exp Cell Res* 2003; 282(2): 90-100.

Faler BJ, Macsata RA, Plummer D, Misha L, Sidawy An. Transforming growth factor-beta and wound healing. *Perspect Vas Surg Endovasc Ther.* 2006; 18(1): 55-62.

Fan JM, Ng YY, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, *et al.*: Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int* 1999; 56(4):1455-1467.

Forino M, Torregrossa R, Ceol M, Murer L, Vella MD, Prete DD, *et al.* TGFbeta1 induces epithelial-mesenchymal transition, but not myofibroblast

transdifferentiation of human kidney tubular epithelial cells in primary culture. *Int J Exp Pathol*. 2006; 87(3):197-208.

Foster W, Li Y, Usas A, Somogyi G, Huard J. Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. *J Orthop Res*. 2003; 21(5): 798-804.

Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB: Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80(12): 3676-3680.

Gabbiani G. The biology of the myofibroblasts. *Kidney Int*. 1992; 41(3): 530-532.

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

Gabbiani G: The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*. 2003; 200(4):500-503.

Gagliano N, Moscheni C, Dellavia C, Torri C, Stabellini G, Ferrario VF, Gioia M: Effect of cyclosporin A on human gingival fibroblast collagen turnover in relation to the development of gingival overgrowth: an in vitro study. *Biomed Pharmacother*. 2004; 58(4): 231-238.

Garrett Q, Khaw PT, Blalock TD, Schultz GS, Grotendorst GR, Daniels JT: Involvement of CTGF in TGF-beta1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45(4):1109-1116.

Gerards AH, Landewé RBM, Prins APA, Bruijn GAW, Goei Thè HS, Laan RFJM, et al. Cyclosporin A monotherapy versus cyclosporin A and methotrexate combination

therapy in patients with early rheumatoid arthritis: a double blind randomised placebo controlled trial. *Ann Rheum Dis*. 2003; 62(4): 291-296.

Ghosh AK, Yuan W, Mori Y, Chen Sj, Varga J. Antagonistic regulation of type I collagen gene expression by interferon-gamma and transforming growth factor-beta. Integration at level of p300/CBP transcriptional coactivators. *J Biol Chem*. 2001; 276(14): 11041-11048.

Giannopoulou M, Iszkula SC, Dai C, Tan X, Yang J, Michalopoulos GK, *et al*. Distinctive role of Stat3 and Erk-1/2 activation in mediating interferon-gamma inhibition of TGF-beta1 action. *Am J Physiol*. 2006; 290(5): F1234-1240. Epub 2005 Dec 6.

Gomez E, Sanchez-Nunez M, Sanchez JE, Corte C, Aguado S, Portal C, Baltar J, Alvarez-Grande J: Treatment of cyclosporin-induced gingival hyperplasia with azithromycin. *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 12(12): 2694-2697.

Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P: Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *Embo J*. 2002; 21(7):1743-1753.

Govinden R, Bhoola KD: Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther*. 2003; 98(2):257-265.

Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S: Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci*. 2002; 7:d793-807.

Grotendorst GR, Duncan MR: Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *Faseb J*. 2005; 19(7): 729-738.

Grotendorst GR, Rahmanie H, Duncan MR: Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *Faseb J.* 2004; 18(3):469-479.

Gu L, Zhu YJ, Guo ZJ, Xu XX, Xu WB: Effect of IFN-gamma and dexamethasone on TGF-beta1-induced human fetal lung fibroblast-myofibroblast differentiation. *Acta Pharmacol Sin.* 2004; 25(11): 1479-1488.

Hallmon WW, Rossmann JA. The role of drugs in the pathogenesis of gingival overgrowth. A collective review of current concepts. *Periodontol* 2000. 1999; 21: 176-96.

Hasegawa T, Nakao A, Sumiyoshi K, Tsuboi R, Ogawa H. IFN-gamma fails to antagonize fibrotic effect of TGF-beta on keloid-derived dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2003; 32(1): 19-24.

Hinz B, Gabbiani G. Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost.* 2003, 90(6): 993-1002.

Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, Nourse J, Crabtree GR: The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996; 80(3Pt 2): S40-45.

Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, Shimbo T, Suthanthiran M: Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature.* 1999; 397(6719): 530-534.

Holmes A, Abraham DJ, Sa S, Shiwen X, Black CM, Leask A: CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem.* 2001; 276(14): 10594-10601.

Huang X, Lee C: From TGF-beta to cancer therapy. *Curr Drug Targets*. 2003; 4(3):243-250.

Ishida Y, Kondo T, Takayasu T, Iwakura Y, Mukaida N. The essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TGF-beta in the skin wound-healing process. *J Immunol*. 2004; 172(3): 1848-1855.

Kahan BD: Cyclosporine: a revolution in transplantation. *Transplant Proc*. 1999; 31(1-2A):14S-15S.

Kataoka M, Kido J, Shinohara Y, Nagata T: Drug-induced gingival overgrowth--a review. *Biol Pharm Bull*. 2005; 28(10): 1817-1821.

Kataoka M, Shimizu Y, Kunikiyo K, Asahara Y, Yamashita K, Ninomiya M, *et al*. Cyclosporin A decreases the degradation of type I collagen in rat gingival overgrowth. *J Cell Physiol*. 2000; 182(3): 351-358.

Kovarik JM, Burtin P: Immunosuppressants in advanced clinical development for organ transplantation and selected autoimmune diseases. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2003; 8(1):47-62.

Kucich U, Rosenbloom JC, Herrick DJ, Abrams WR, Hamilton AD, Sebti SM, Rosenbloom J: Signaling events required for transforming growth factor-beta stimulation of connective tissue growth factor expression by cultured human lung fibroblasts. *Arch Biochem Biophys*. 2001; 395(1):103-112.

Kurreck J. siRNA Efficiency: structure or sequence – that is the question. *J Biomed Biotechnol*. 2006; 2006(4): 1-7.

Kwun WH, Suh BY, Kwun KB: Effect of azithromycin in the treatment of cyclosporine-induced gingival hyperplasia in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2003; 35(1): 311-312.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 252(19): 6573-6576.

Larrabee WF Jr. Keloid excision and recurrence prophylaxis via interdermal interferon-gamma injections. *Laryngoscope.* 1997; 107(9): 1284.

Linden GJ, Haworth SE, Maxwell AP, Poulton KV, Dyer PA, Middleton D, *et al.* The influence of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms on the severity of gingival overgrowth associated with concomitant use of cyclosporin A and a calcium channel blocker. *J Periodontol.* 2001; 72(6): 808-814.

Lucey MR, Abdelmalek MF, Gagliardi R, Granger D, Holt C, Kam I, *et al.* A comparison of tacrolimus and cyclosporine in liver transplantation: effects on renal function and cardiovascular risk status. *Am J Transplant.* 2005; 5(5): 1111-1119.

Malmström J, Lindberg H, Lindberg C, Bratt C, Wieslander E, Delander EL, *et al.* Transforming growth factor-beta 1 specifically induce proteins involved in the myofibroblast contractile apparatus. *Mol Cell Proteomics.* 2004; 3(5): 466-477. Epub 2004 Feb 6.

Mariani G, Calastrini C, Aleotti A, Carevale E, Stabellini G: Ultrastructural changes in Langerhans cells in gingival overgrowth in cyclosporin A-treated renal transplant patients. *Pathology.* 2004; 36(3): 242-246.

Massague J, Gomis RR: The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett* 2006; 580(12):2811-2820.

Massague J, Wotton D: Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J*. 2000; 19(8):1745-1754.

Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 1998; 67: 753-791.

Maurer, G: Metabolism of cyclosporine. *Transplant Proc*. 1985; 17(4 Suppl 1): 19-26.

McCulloch CA, Bordin S. Role of fibroblasts subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodontal Res*. 1991; 26(3 Pt 1): 144-154.

McDonald JW, Feagan BG, Jewell D, Brynskov J, Stange EF, MacDonald JK. Cyclosporine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005; 18(2): CD000297.

McMorrow T, Gaffney MM, Slattery C, Campbell E, Ryan MP: Cyclosporine A induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(10): 2215-2225.

Mehra A, Wrana JL: TGF-beta and the Smad signal transduction pathway. *Biochem Cell Biol* 2002; 80(5): 605-622.

Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH: Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt24): 4359-4369.

Niimi A, Tohnai I, Kaneda T, Takeuchi M, Nagura H: Immunohistochemical analysis of effects of cyclosporin A on gingival epithelium. *J Oral Pathol Med*. 1990; 19(9): 397-403.

O'Kane S, Ferguson MW: Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997; 29(1):63-78.

Pedraz J, Dauden E, Delgado-Jymenez Y, Garcia-Rio I, Garcia-Diez A. Sequential study on the treatment of moderate-to-severe chronic plaque psoriasis with mycophenolate mofetil and cyclosporin. *JEur Acad Dermatol Venereol.* 2006; 20(6): 702-706.

Pereira TM, Vieira AP, Fernandes JC, Sousa-Basto A. Cyclosporin A treatment in severe childhood psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2006; 20(6): 651-656.

Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta 1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension.* 2002; 39(2): 258-263.

Phan SH: The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest.* 2002; 122(6Suppl): 286S-289S.

Phipps RP, Borrello MA, Blieden TM. Fibroblasts heterogeneity in the periodontium and other tissues. *J Periodontal Res.* 1997; 32(1 Pt 2): 159-165.

Pittet B, Rubbia-Brandt L, Desmouliere A, Sappino AP, Roggero P, Guerret S, et al. Effect of gamma-interferon on the clinical and biologic evolution of hypertrophic scars and Dupuytren's disease : a open pilot study. *Plast Reconstr Surg.* 1994; 93(6): 1224-1235.

Ponticelli C: Generic cyclosporine: a word of caution. *J Nephrol.* 2004; 17 Suppl 8:S20-24.

Qi W, Twigg S, Chen X, Polhill TS, Poronnik P, Gilbert RE, *et al.*: Integrated actions of transforming growth factor-beta1 and connective tissue growth factor in renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 288(4): F800-809.

Radwan-Oczko M, Boratynska M, Zietek M, Zoledziawska M, Jonkisz A: The relationship of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms, its plasma level, and gingival overgrowth in renal transplant recipients receiving different immunosuppressive regimens. *J Periodontol*. 2006; 77(5): 865-873.

Ramos C, Montano M, Garcia-Alvarez J, Ruiz V, Uhal BD, Selman M, Pardo A: Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001; 24(5): 591-598.

Rezzani R. Cyclosporine A and adverse effects on organs: histochemical studies. *Prog Histochem Cytochem*. 2004; 39(2): 85-128.

Rezzani R: Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: the morphological and immunohistochemical studies. *Histol Histopathol*. 2006; 21(3): 301-316.

Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New classes of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78(9): 5339-5343.

Savage NW, Seymour GJ, Robinson MF: Cyclosporin-A-induced gingival enlargement. A case report. *J Periodontol*. 1987; 58(7): 475-480.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004; 75(2): 163-189.

Serini G, Gabbiani G: Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res*. 1999; 250(2):273-283.

Seymour RA, Jacobs DJ: Cyclosporin and the gingival tissues. *J Clin Periodontol*. 1992; 19(1): 1-11.

Seymour RA, Smith DG. The effect of plaque control programme on the incidence and severity of cyclosporin-induced gingival changes. *J Clin Periodontol*. 1991; 18(2): 107-110.

Seymour RA: Effects of medications on the periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2006; 40: 120-129.

Shin GT, Khanna A, Ding R, Sharma VK, Lagman M, Li B, Suthanthiran M: In vivo expression of transforming growth factor-beta1 in humans: stimulation by cyclosporine. *Transplantation*. 1998; 65(3): 313-318

Slattery C, Campbell E, McMorro T, Ryan MP: Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition. *Am J Pathol*. 2005; 167(2): 395-407.

Smith PC, Cáceres M, Martinez J. Induction of the myofibroblastic phenotype in human gingival fibroblasts by transforming growth factor β : role of RhoA-ROCK and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways. *J Periodont Res*. 2006; 41(5): 418-425.

Sooriyamoorthy M, Gower DB, Eley BM. Androgen metabolism in gingival hyperplasia induced by nifedipine and cyclosporine. *J Periodontal Res*. 1990; 25(1): 25-30.

Sooriyamoorthy M, Gower DB. Phenytoin stimulation of testosterone metabolism in inflamed human gingival fibroblast. *Biochem Soc Trans.* 1989; 17(6): 1020-1021.

Spolidorio LC, Merzel J, Villalba H, Vargas PA, Coletta RD, Almeida OP: Morphometric evaluation of gingival overgrowth and regression caused by cyclosporin in rats. *J Periodontal Res.* 2001; 36(6): 384-389.

Spolidorio LC, Spolidorio DM, Holzhausen M, Nassar PO, Nassar CA: Effects of long-term cyclosporin therapy on gingiva of rats--analysis by stereological and biochemical estimation. *Pesqui Odontol Bras.* 2005; 19(2): 112-118.

Strutz F, Heeg M, Kochiek T, Siemers G, Zeisberg M, Muller GA. Effects of pentoxifylline, pentifylline and gamma-interferon on proliferation, differentiation, and matrix synthesis of human renal fibroblasts. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15(10): 1535-1546.

Tanaka K, Sano K, Yuba K, Katsumura K, Nakano T, Tanaka K, *et al.* Inhibition of induction of myofibroblast by interferon gamma in a human fibroblasts cell line. *Int Immunopharmacol.* 2003; 3(9): 1273-1280.

Tanaka T, Takahara S, Hatori M, Suzuki K, Wang J, Ichimaru N, Suzuki S, Morozumi K, Okuyama A, Yamanaka H: A novel immunosuppressive drug, FTY720, prevents the cancer progression induced by cyclosporine. *Cancer Lett.* 2002; 181(2): 165-171.

Thomason JM, Kelly PJ, Seymour RA: The distribution of gingival overgrowth in organ transplant patients. *J Clin Periodonl.* 1996a; 23(4): 367-371.

Thomason JM, Seymour RA, Ellis JS, Kelly PJ, Parry G, Dark J, Wilkinson R, Ilde JR: Determinants of gingival overgrowth severity in organ transplants patients. *An*

examination of the role of HLA phenotype. *J Clin Periodontol*. 1996b; 23(7): 628-634.

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA: Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3(5):349-363.

Trackman PC, Kantarci A: Connective tissue metabolism and gingival overgrowth. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15(3):165-175.

Tucker RF, Volkenant ME, Branun EC, Moses HL. Comparison of intra and extracellular transforming growth factor from non-transformed and chemically transformed mouse embryo cells. *Cancer Res*. 1983; 43(4): 1581-1586.

Ulloa L, Doody J, Massague J: Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature*. 1999; 397(6721):710-713.

Uzel MI, Kantarci A, Hong HH, Uygur C, Sheff MC, Firatli E, Trackman PC: Connective tissue growth factor in drug-induced gingival overgrowth. *J Periodontol*. 2001; 72(7): 921-931.

Vaquero E, Molero X, Tian X, Salas A, Malagelada JR: Myofibroblast proliferation, fibrosis, and defective pancreatic repair induced by cyclosporin in rats. *Gut*. 1999; 45(2):269-277.

Vescovi P, Meleti M, Manfredi M, Merigo E, Pedrazzi G: Cyclosporin-induced gingival overgrowth: a clinical-epidemiological evaluation of 121 Italian renal transplant recipients. *J Periodontol*. 2005; 76(8): 1259-1264.

Waiser J, Dell K, Bohler T, Dogu E, Gaedeke J, Budde K, Neumayer HH: Cyclosporine A up-regulates the expression of TGF-beta1 and its receptors type I and type II in rat mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17(9): 1568-1577.

Wang P, Heitman J: The cyclophilins. *Genome Biol*. 2005; 6(7): 226.

Wen FQ, Liu X, Kobayashi T, Abe S, Fang Q, Kohyama T, *et al*. Interferon-g inhibits transforming growth factor- β production in human airway epithelial cells by targeting Smads. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004; 30(6):816-822.

Willis BC, duBois RM, Borok Z: Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc*. 2006; 3(4):377-382.

Wright G, Welbury RR, Hosey MT: Cyclosporin-induced gingival overgrowth in children. *Int J Paediatr Dent*. 2005; 15(6): 403-411.

Yamanaka O, Saika S, Okada Y, Ooshima A, Ohnishi Y. Effects of interferon-gamma on human subconjunctival fibroblasts in the presence of TGF-beta 1: reversal of TGF-beta 1 stimulated collagen production. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2003; 241(2): 116-124.

Yamasaki A, Rose GG, Pinero GJ, Mahan CJ: Ultrastructure of fibroblasts in cyclosporin A-induced gingival hyperplasia. *J Oral Pathol*. 1987; 16(3): 129-134.

Yang J, Liu Y: Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol*. 2001; 159(4): 1465-1475.

Yao HW, Xie QM, Chen JQ, Deng YM, Tang HF: TGF-beta1 induces alveolar epithelial to mesenchymal transition in vitro. *Life Sci*. 2004; 76(1):29-37.

Yokoi H, Sugawara A, Mukoiama M, Mori K, Makino H, Suganami T, *et al.* Role of connective tissue growth factor in profibrotic action of transforming growth factor-beta: a potential target for preventing renal fibrosis. *Am J Kidney Dis.* 2001; 38(4 Suppl 1): S134-138.

Yoshida T, Nagata J, Yamane A: Growth factors and proliferation of cultured rat gingival cells in response to cyclosporin A. *J Periodontal Res.* 2005; 40(1): 11-19.

Zhang C, Meng X, Zhu Z, Liu J, Deng A: Connective tissue growth factor regulates the key events in tubular epithelial to myofibroblast transition in vitro. *Cell Biol Int.* 2004; 28(12):863-873.

Anexos

----- Original Message -----

From: <cpeedoffice@oxon.blackwellpublishing.com>

To: <coletta@fop.unicamp.br>

Sent: Tuesday, January 16, 2007 5:33 AM

Subject: Journal of Clinical Periodontology - Decision on Manuscript ID CPE-09-06-0853.R2

16-Jan-2007

Dear Prof. Ricardo Coletta ,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Opposite effects of TGF- β 1 and IFN γ on transdifferentiation of myofibroblast in human gingival cell cultures" in its current form for publication in Journal of Clinical Periodontology. The comments, if any, of the reviewer(s) who refereed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Journal of Clinical Periodontology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

The manuscript now becomes the copyright of this journal. In accordance with accepted practice, the research findings reported in this paper must not appear in another publication before its publication in this journal.

If you haven't already signed the Exclusive Licence Form, please go to the following website to print the form

http://www.blackwellpublishing.com/pdf/copyright_CPE.pdf

Please send the Exclusive Licence Form to Journal of Clinical Periodontology Editorial Office, Blackwell Munksgaard, Rosenorns Allé 1, 1970 Frederiksberg C, Denmark.

As part of the Journal's continued commitment to its authors, the Editorial Office and Publisher wish to keep you informed about what will happen next and, as the attached paper contains information regarding journal publication and services for authors, you may wish to save it for future reference.

Sincerely,
Maurizio Tonetti
Editor in Chief, Journal of Clinical Periodontology.



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 723-1, sobre "PRESENÇA, FUNÇÃO E MECANISMOS DE TRANSDIFERENCIAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS NOS AUMENTOS GENGIVAIS INDUZIDOS POR CICLOSPORINA E NA FIBROMATOSE GENGIVAL HEREDITÁRIA. EM ESTUDO IN VIVO E IN VITRO" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Ricardo Della Coletta está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 09 de setembro de 2004.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 723-1, entitled "THE ROLE OF THE MYOFIBROBLASTS IN CYCLOSPORIN-INDUCED GINGIVAL OVERGROWTH AND IN HEREDITARY GINGIVAL FIBROMATOSIS. AN IN VIVO AND IN VITRO STUDY", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on September 9, 2004.

Campinas, 09 de setembro de 2004.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Participação dos miofibroblastos no aumento gengival induzido por ciclosporina, na fibromatose gengival hereditária e nos carcinomas espinocelulares orais**", protocolo nº **141/2006**, dos pesquisadores **RICARDO DELLA COLETTA, LAYS MARTIN SOBRAL, MICHELE GASSEN KELLERMANN e PATRICK FRANZ MONTAN**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 18/10/2006.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "**Myofibroblasts participation in gingival overgrowth induced by cyclosporine, hereditary gingival fibromatosis and oral spinocellular carcinoma**", register number **141/2006**, of **RICARDO DELLA COLETTA, LAYS MARTIN SOBRAL, MICHELE GASSEN KELLERMANN and PATRICK FRANZ MONTAN**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 18/10/2006.


Prof. Cecília Gatti Guirado

Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Jacks Jorge Júnior

Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.