



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



1290004947

TCC/UNICAMP
As27s
FOP

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Fernanda Aseredo



Orientador(a): Ricardo Della Coletta

Ano de Conclusão do Curso: 2009



Assinatura do(a) Orientador(a)



10.578



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



**SUPEREXPRESSÃO DE SMAD 7 BLOQUEIA OS EFEITOS DE CICLOSPORINA A
NA PROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASE DE
MATRIZ 2 (MMP2) EM FIBROBLASTOS GENGIVAIS**

Monografia apresentada ao Curso de Odontologia
da Faculdade de Odontologia de Piracicaba –
UNICAMP, para obtenção do Diploma de
Cirurgião-Dentista.

Aluno(a): Fernanda Aseredo

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Piracicaba

(2009)

Unidade - FOP/UNICAMP
TCC/UNICAMP
As27s Ed.
Vol. Ex.
Tombo 4947
C D
Proc. 10P-134/10
Pr. R\$ 11,00
D 12/08/10
R 7E835-3

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

As27s Aseredo, Fernanda.
Superexpressão de Smad 7 bloqueia os efeitos de ciclosporina A na proliferação celular e expressão de metaloproteinase de matriz 2 (MMP2) em fibroblastos gengivais. / Fernanda Aseredo. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.
51f. : il.
Orientador: Ricardo Della Coletta.
Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
1. Gengivas – Doenças. 2. Fator de crescimento transformante-beta 1. I. Della Coletta, Ricardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.
(mg/fop)

Dedico este trabalho

À Deus,

Por muitas vezes me levar pelas mãos, guiar meu caminho e me dar saúde e forças para lutar.

Aos meus pais,

Por sua confiança, apoio, conforto e dedicação em todos esses longos anos.

Ao meu irmão,

Que sempre foi meu melhor amigo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Della Coletta,

Por toda paciência e dedicação ao me ensinar, tornando-se meu mestre e exemplo.

Agradecimentos

Aos meus pais e irmão, família incomparável, que me apoiou, escutou, incentivou e guiou durante minha jornada e que sem eles, jamais estaria onde estou hoje.

Aos meus avós, presentes ou ausentes, que torceram, mesmo que de longe para meu sucesso e apostaram em mim.

À minha família em geral, pelo apoio e preocupação.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba- Unicamp, por ter me dado base para conseguir vencer novos desafios que estão por vir.

À FAPESP, pelo apoio financeiro, de extrema importância para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, por nunca ter poupado esforços, estar sempre disponível para me ajudar e ensinar e por sua compreensão e amizade durante esses anos de estágio.

À pós-graduanda Lays Martin Sobral, pela paciência e carinho, pelos ensinamentos e amizade durante a realização de meu trabalho.

Para o pessoal do laboratório de Patologia em geral, pessoas maravilhosas que sempre me ajudaram e deixavam o ambiente agradável de se trabalhar.

Às minhas amigas Bruna, Flávia, Juliana e Luciana pelos anos de amizade incondicional e todas as outras que participaram da minha formação, acompanhando-me nos momentos alegres e apoiando-me nos momentos difíceis.

À todos que, ao passarem por minha vida, deixaram algum ensinamento, compartilharam alguma alegria ou até mesmo aceitaram um desabafo.

E a Deus, por ter tornado possível a realização de meu trabalho e ter colocado todas essas pessoas em meu caminho.

SUMÁRIO

Lista de Ilustrações	08
Lista de Palavras e Abreviaturas em Latim	09
1. Resumo	10
2. Introdução	11
3. Objetivos	19
4. Materiais e Métodos	19
4.1. Culturas Celulares	19
4.2. Plasmídeos	20
4.3 Western Blot	21
4.4. Grupo de análise	22
4.5. Ensaio de ELISA para colágeno Tipo I	22
4.6 Ensaio de ELISA para TGF-β1 e MMP-2	23
4.7. Análise do crescimento celular	24
4.8. Ensaio de incorporação de BrdU	26
4.9. Análise zimográfica para MMP-2	26
4.10. Caracterização de MMP-2	27
4.11. Análise Estatística	28
5. Resultados	
5.1. Caracterização das células superexpressando Smad 7	28
5.2. Influência da superexpressão de Smad 7 na proliferação celular controlada por CsA	29

5.3. Influência da superexpressão de Smad 7 na produção de MMP-2 controlada por CsA	30
5.4. Influência da superexpressão de Smad 7 na produção de colágeno tipo I controlada por CsA	31
6. Discussão	41
7. Conclusões	44
8. Referências Bibliográficas	44

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	25
Figura 2	33
Figura 3	34
Figura 4	35
Tabela 1	36
Figura 5	37
Figura 6	38
Figura 7	39
Figura 8	40

LISTA DE PALAVRAS E ABREVIATURAS EM LATIM

CsA= Ciclosporina A

GN= Gengiva Normal

TGF- β 1= Fator de Crescimento Transformante- Beta 1

RT-PCR= Ensaio Semi-Quantitativo da Transcriptase Reaversa- Reação em Cadeia da Polimerase

WB= Western Blot

MMP-2= Metaloproteinase de Matriz 2

ELISA= Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

DMEM= Meio de Eagle modificado por Dulbecco

cDNA= Ácido Desoxirribonucléico complementar

BrdU= Bromodioxiidina

pSmad2= Forma fosforilada de Smad2

1. Resumo

Estudos prévios demonstraram que o fator de crescimento transformante- β 1 (TGF- β 1) é encontrado em níveis elevados em aumentos gengivais induzidos por ciclosporina A (CsA), controlando os principais eventos relacionados ao aumento gengival incluindo proliferação celular, produção de colágeno tipo I e síntese de MMP-2. O objetivo deste estudo foi determinar se a superexpressão de Smad7, um inibidor da cascata de ativação de TGF- β 1, inibe os eventos associados ao aumento gengival induzido por CsA. Para determinar os efeitos da superexpressão de Smad7, clones celulares específicos de fibroblastos de gengiva normal (GN) foram estabelecidos através da transfecção estável de plasmídeos contendo o cDNA humano de Smad7 ou plasmídeos vazios. Após confirmação da superexpressão de Smad7 por WB e confirmação da inibição da atividade de TGF- β 1 por quantificação de p-Smad2, os clones específicos foram tratados com 200 ng/ml de CsA e a proliferação celular (curva de crescimento e ensaio de BrdU), síntese de colágeno tipo I (ELISA) e produção e atividade de MMP-2 (ELISA e zimograma) foram determinados. Nossos resultados claramente demonstraram que a superexpressão de Smad7 em fibroblastos de GN inibe os efeitos de CsA na indução da proliferação celular, elevação dos níveis de produção de colágeno tipo I e inibição da síntese e atividade de MMP-2. Em conclusão, nossos dados sugerem que a inibição da cascata de ativação de TGF- β 1 via superexpressão de Smad7 pode ser clinicamente efetivo no tratamento dos aumentos gengivais induzidos por CsA.

2. Introdução

Aumento gengival é uma definição genérica usada clinicamente diante de uma alteração volumétrica da gengiva. Esta condição clínica pode ser causada por diversos fatores, incluindo processos inflamatórios, infiltração tumoral, herança genética, ações iatrogênicas, origem idiopática ou ser resultado de efeitos colaterais de medicamentos sistêmicos (Dongari-Bagtzoglou, 2004). Os aumentos gengivais de origem medicamentosa são os mais freqüentes e estão associados ao uso de 3 drogas principais: fenitoína, uma droga com efeito anticonvulsivante, nifedipina, um bloqueador de canais de cálcio, e CsA, uma droga com intensa atividade imunossupressora (Trakman & Katarci, 2004).

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 (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). 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 interferon gama 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 interleucina 3 (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, muitos estudos demonstraram um estímulo na produção de TGF-β1, que pode estar envolvido com o desenvolvimento dos principais efeitos colaterais associados ao uso do medicamento. Por exemplo, TGF-β1 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 (Guaré & Franco, 1998). 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). 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%. 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, idade do paciente, tipo de órgão transplantado, susceptibilidade genética do indivíduo e capacidade de metabolismo da droga (Vescosi et al., 2005; Wright et al., 2001).

Embora exista um grande esforço no intuito de compreender os mecanismos biológicos que fazem com que CsA induza os aumentos gengivais, a patogênese deste efeito colateral permanece desconhecida. Contudo, 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 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, o que é substanciado pelas características histológicas do tecido gengival (McCulloch et al, 2004). 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 estudada em tecidos ou culturas celulares de fibroblastos tratadas com CsA (Cotrim et al., 2002; McCulloch et AL, 2004; Chae et al., 2006).

CsA estimula 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 não é induzida (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 (Bartold, 1989; Yoshida et al., 2005; Chae et al., 2006). Yoshida et al. (2005) demonstraram em culturas celulares de tecido gengival de ratos que o efeito da CsA na indução da proliferação celular é acompanhado por aumento na expressão de fatores de crescimento, como TGF- β 1 e fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2). Contudo, um estudo demonstrou que o efeito de CsA na proliferação de fibroblastos gengivais é variável e dependente da linhagem celular (Hallmon & Rossmann, 1999).

Gagliano et al. (2004) demonstraram que culturas celulares de fibroblastos de gengiva normal 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 imuno-histoquímicas aumento gradativo na densidade dos feixes de fibras de colágeno tipo I, que foi acompanhado por diminuição na expressão das colagenases. Bolzani et al. (2000) demonstraram 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 inibição na expressão de MMP-1 e MMP-2 por culturas celulares humanas tratadas com CsA de modo dose-dependente. Arora et al. (2001) demonstraram uma diminuição da atividade fagocitária de fibroblastos gengivais quando submetidos ao tratamento com CsA. 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 significativamente reduzido (Cotrim et al., 2003).

TGF- β 1 é uma citocina multifuncional pertencente a 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 foi primeiramente identificado através da purificação de proteínas da placenta humana em 1983 (Frolik et al., 1983). A denominação TGF é devido a habilidade deste fator permitir que células normais cresçam em uma condição independente da ancoragem (crescimento em *soft agar*); 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 matriz extracelular por fibroblastos (O'Kane & Ferguson, 1997; Kucich et al., 2001; Govinden & Bhoola, 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 comentada neste projeto) e cascata MAPK (Derynck & Zhang, 2003; Colwell et al., 2006). O início da sinalização necessita da ligação de TGF- β 1 aos receptores transmembrânicos. Esta interação ligante-receptor ativa os mensageiros citoplasmáticos da cascata Smad. Existem 8 proteínas Smads descritas em vertebrados (Smad 1- 8). Smad 2 e Smad 3 são ativados por TGF- β 1 (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 Smad4 e são translocados 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). Smad6 e Smad 7 possuem uma atividade inibitória nesta cascata, competindo pelos receptores ativados e impedindo a fosforilação de Smad 2 e Smad 3 (Derynck & Zhang, 2003).

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). Então, drogas que interferem com TGF- β 1 podem ser extremamente úteis no tratamento de aumentos gengivais induzidos por CsA. Nos últimos anos, nosso grupo tem centrado esforços para compreender o papel de TGF- β 1 nos aumentos gengivais induzidos por CsA e nos aumentos gengivais hereditários, a fibromatose gengival hereditária (FGH). Em FGH, nós demonstramos que a produção elevada de TGF- β 1 esta

associada com a indução da transdiferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, um tipo celular altamente especializado e com a capacidade de produzir grandes quantidades de matriz extracelular (Bitu et al., 2006). Adicionalmente, nós demonstramos que o tratamento com interferon gama inibe a transdiferenciação dos miofibroblastos e significativamente reduz a produção de colágeno tipo I, via interferência na atividade de TGF- β 1. Tratamento com interferon gama rapidamente induziu a expressão de Smad 7, inibindo a cascata de ativação de TGF- β 1 (Sobral et al., 2007). Os resultados descritos acima coletivamente sugerem que o bloqueio da atividade de TGF- β 1, via superexpressão de Smad 7, pode ser útil para minimizar os efeitos de CsA na indução do aumento gengival.

3. Objetivos

O objetivo deste projeto foi determinar o efeito da neutralização da atividade de TGF- β 1, via superexpressão de Smad 7, na proliferação celular e síntese de MMP-2 de fibroblastos gengivais tratados com CsA.

4. Material e Métodos

4.1. Culturas celulares

Culturas celulares de fibroblastos de GN foram previamente obtidas, utilizando-se da técnica do explante e encontravam-se armazenadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Cultivo Celular da Área de Patologia Bucal e Genética da FOP-UNICAMP. As células foram descongeladas e mantidas em DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) (Invitrogen), contendo 10% de

soro fetal bovino, 100 µl/ml de penicilina, 120 µl/ml de sulfato de kanamicina a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂.

4.2. Plasmídeos, Transfecção e Seleção de Clones

O plasmídeo pcDNA3 (Invitrogen) contendo o cDNA completo do gene humano Smad 7 fusionado a um pequeno fragmento do proto-oncogene c-Myc (pcDNA3-Myc-Smad 7) foi cedido pelo Dr. Azeddine Atfi, da Universidade de Paris, França. Como controle, foi utilizado o mesmo plasmídeo contendo o gene CAT no local de Myc-Smad 7. A expansão dos plasmídeos foi realizada através da transformação de bactérias *E. coli* competentes DH5- α (Invitrogen) pelo método de choque térmico e formação de colônias resistentes em meio LB-ágar contendo antibiótico (ampicilina, Invitrogen). Após expansão de uma colônia em 5 ml de meio LB líquido, os plasmídeos de expressão foram purificados com o Kit da Invitrogen, de acordo com as instruções do fabricante. A transfecção e seleção de clones celulares individuais superexpressando o gene de interesse foram realizadas como descrito (Coletta et al., 2004). Resumidamente, células cultivadas com uma confluência de 50-60% foram tratadas por 8-10 h com uma mistura de 1 ml de meio de cultura (Opti-MEM, Invitrogen) sem soro fetal bovino ou antibióticos contendo 2 µg/µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) e 2 µg/ml de plasmídeo. Após o período de transfecção, as células foram cultivadas com meio de cultura até confluência, de onde serão expandidas 1:10 e incubadas com meio de cultura contendo antibiótico de seleção (200 µg/ml de ampicilina, Invitrogen). As colônias sobreviventes foram isoladas com o auxílio de anéis de clonagem, propagadas, testadas quanto da superexpressão do gene de interesse e estocadas em

nitrogênio líquido. A eficiência da superexpressão do gene de interesse foi realizada por reações de RT-PCR e/ou WB (Bitu et al., 2006).

4.3. Western Blot

As culturas celulares foram coletadas, lavadas em PBS e incubadas com tampão contendo 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM NaCl, 1 mM EDTA e inibidores de proteína (1mM fluoreto de metilfenilsulfonil (PMSP), 1 mM N-etilmaleimida (NEM), 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, 50 µg de proteína total de cada amostra foi misturada com tampão de amostra redutor (2% SDS, 125 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glicerol, 0,001% azul de bromofenol e 20% DTT), fervida por 10 min e separada eletroforéticamente em gel 10% SDS-PAGE. O material eletroforizado foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (poro de 0,45 mm; Invitrogen). As membranas foram tratadas por 16 h a 4°C com PBS acrescido de 10% leite desnatado e incubado com anticorpos primários por 2 h. Os anticorpos primários deste estudo foram anti-Smad 7 e anti-pSmad 2 (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA). Após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase e reveladas com o kit de quimioluminescência seguindo normas do fabricante (Amershan Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL, EUA). A membrana foi então envolta por plástico e exposta ao filme radiográfico.

4.4. Grupos de análise

- Linhagens celulares de fibroblastos de GN (Controle negativo)
- Linhagens celulares de fibroblastos de GN tratadas com 200 ng/ml de CsA (Controle positivo)
- Linhagens celulares de fibroblastos de GN expressando o plasmídeo controle
- Linhagens celulares de fibroblastos de GN expressando o plasmídeo controle tratadas com 200 ng/ml de CsA
- Linhagens celulares de fibroblastos de GN expressando o plasmídeo contendo o gene Smad7
- Linhagens celulares de fibroblastos de GN expressando o plasmídeo contendo o gene Smad7 tratadas com 200 ng/ml de CsA

4.5. Ensaio de ELISA para Colágeno tipo I

Células foram plaqueadas a uma densidade de 7×10^4 células/well em triplicata em uma placa de 24-wells. Foram utilizadas 2 placas: uma para a realização do ELISA e outra para a contagem do número de células pela técnica de coloração com azul de toluidina (Scragg & Ferreira, 1991). Nestas placas, 3 wells de cada linhagem foram cultivadas com DMEM e 3 wells foram cultivadas com DMEM acrescido de 200 ng/ml de CsA. O tratamento se fez durante 3 dias. Após este período o sobrenadante foi coletado e as células foram lisadas em 500 μ l a 0,5 M de 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 as placas de ELISA de 96 poços por 2 h. Os poços foram lavados e os 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% foram adicionados os anticorpos anti-colágeno tipo I humano conjugado à biotina (Chemicon Int, Temecula, CA, EUA) na diluição de 1:2000 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 0-fenilenodiamina de 0,1 M de tampão fosfato-citrato pH 5.0 contendo 0,05% de H₂O₂. A reação foi finalizada pela adição de 2 N H₂SO₄ e a absorbância avaliada em 490 nm utilizando um leitor automático de ELISA (Bio Rad, Hercules, CA, EUA). Uma curva padrão foi construída utilizando colágeno tipo I purificado de placenta humana (Chemicon Int) e os valores expressos como ng de colágeno tipo I/célula.

4.6. Ensaio de ELISA para TGF-β1 e MMP-2

A produção de TGF-β1 e MMP-2 também foi determinada por ELISA. Células foram plaqueadas a uma densidade de 7×10^4 células/well em triplicata em uma placa de 24-wells. Três wells de cada linhagem foram cultivadas com DMEM e 3 wells foram cultivadas com DMEM acrescido de 200 ng/ml de CsA. O tratamento se fez durante 3 dias. Após este período, o sobrenadante foi coletado e a contagem do número de células foi determinada pela técnica de coloração com azul de toluidina (Scragg & Ferreira, 1991). Wells de uma placa de ELISA foram sensibilizados com 200 µl de meio de cultura por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, os wells foram lavados 3 vezes com 400 µl de PBS contendo 1% de Tween 20 e sítios não específicos foram bloqueados

com 3% BSA em PBS por 2 h. Após lavagens, anticorpos anti-TGF- β 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) ou anti-MMP-2 (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) diluídos 1:200 em PBS foram adicionados aos wells e incubados por 2 h. Após outra etapa de lavagem, anticorpos conjugados a peroxidase (Amersham Pharmacia Biotech) diluídos 1:1000 em PBS foi adicionados e mantidos por 1 h. A reação foi desenvolvida com 0,5 mg/ml de o-fenilenodiamina (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) em 0.5 M de tampão cítrico com pH 5.5 contendo 0.01% H₂O₂ por 20 min. Após terminar a reação com 50 μ l de 2 N H₂SO₄, absorvância foi lida em 450 nm. Os valores foram expressos em TGF- β 1/célula ou MMP-2/célula.

4.7. Análise do crescimento celular

Fibroblastos foram plaqueados a uma concentração de 30.000 células/well em placas de cultura de 24-wells em 2 ml de DMEM acrescido em 10% de soro fetal e foram incubados a 37°C, atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂. No dia seguinte, todos os wells foram lavados com salina tamponada com fosfato (PBS) e o meio de cultura foi trocado para 2 ml de DMEM sem soro fetal bovino, a fim de que todas as células fossem mantidas na mesma fase do ciclo celular (sincronismo celular). Transcorridas 24 h, o meio de cultura foi trocado por 2 ml/well de DMEM acrescido de 2% de soro fetal bovino acrescido ou não de 200 ng/ml de CsA (Sandimmun, Novartis, Brasil). O índice de crescimento celular foi determinado pelo ensaio de coloração com azul de toluidina nos dias 3, 5, 7, 9 e 11. O meio de cultura contendo ou não CsA foi trocado a cada 2 dias.

Para a determinação da população celular, as células foram fixadas com formalina a 10% por 15 min (500 μl /well), lavadas com 500 μl de PBS e coradas com 1% azul de toluidina diluído em solução aquosa de bórax a 1%, por 5 min utilizando 350 μl /well. Após serem coradas, as células foram lavadas 4 vezes para retirar o excesso de corante com água destilada e lisadas com solução aquosa de SDS a 1%, sendo 350 μl /well. A placa foi colocada na estufa à 37°C por 30 min e 100 μl foram transferidos para a uma placa de 96 wells em triplicata. Paralelamente, para determinação do número de células foi construída uma curva padrão correlacionando concentrações celulares crescentes (4, 8, 16, 32, 64 e 128 x 10³ células). A absorbância foi determinada a 630 nm com o leitor automático de ELISA (Bio RAD, Hercules, CA, EUA) e o número de células foi calculado com o auxílio da curva padrão (Fig. 1).

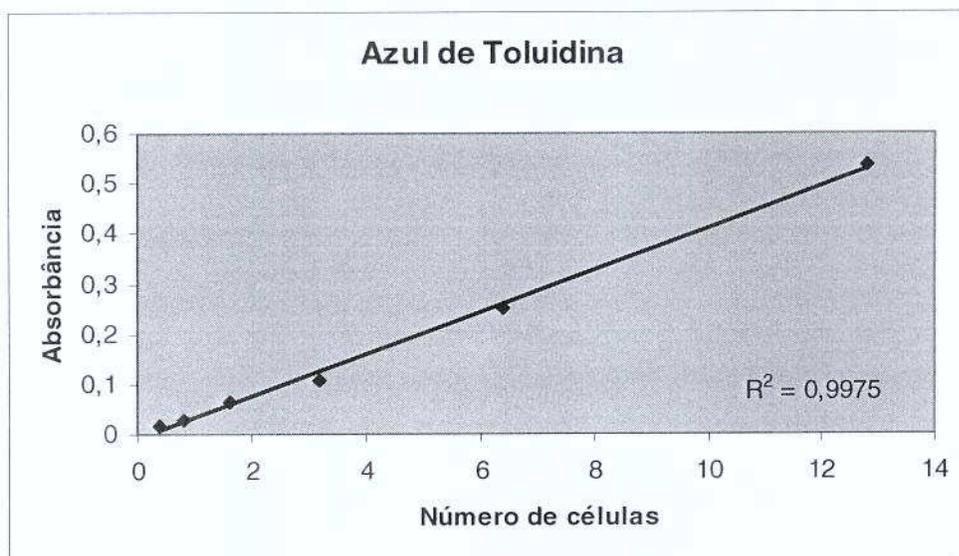


Figura 1. Curva padrão representativa de um dos experimentos de crescimento celular.

4.8. Ensaio de incorporação de BrdU

O efeito da superexpressão de Smad 7 na proliferação celular também foi analisado de incorporação de BrdU, como previamente descrito (Coletta et al., 1998). Brevemente, células plaqueadas a uma densidade de 25.000 células/well em lâminas de cultura de 8-wells (Corning-Costar) foram levadas a quiescência pela adição de meio de cultura sem soro fetal bovino. Transcorrido 24 h, as células foram estimuladas a retornar ao ciclo celular através da adição de meio de cultura contendo 2% de soro fetal bovino e acrescido ou não de CsA por 24 h. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e meio de cultura fresco acrescido de BrdU na diluição de 1:1.000 foi adicionado. Após 1 h de incorporação, as células foram lavadas e fixadas em 70% etanol por 15 min. A incorporação de BrdU nas células em proliferação foi revelada através de análise imuno-histoquímica utilizando protocolos descritos pelo fabricante (Cell Proliferation Kit, Amersham). O índice de incorporação, expresso como porcentagem de células marcadas com BrdU, foi determinado por contagem de 1.000 células, em 3 ensaios independentes, utilizando o sistema de imagem KONTRON400 (Zeiss).

4.9. Análise zimográfica para MMP-2

Fibroblastos (70.000 células/well) em 2 ml de DMEM acrescido em 10% de soro fetal bovino foram plaqueados em wells de uma placa de cultura de 24-wells. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura será trocado para 2 ml de DMEM sem soro fetal bovino. Transcorridas 24 h, 500 µl/well de meio de cultura fresco contendo ou não 200 ng/ml de CsA foram adicionados as células. Após 24 h, os sobrenadantes da cultura foram

coletados, centrifugados para remoção de possíveis restos celulares, incubados com tampão de amostra não-redutor e submetidos a eletroforese em 10% gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) contendo 1 mg/ml de gelatina (Bio Rad), como substrato. O número de células por well foi determinado pela coloração com azul de toluidina. Após eletroforese, o gel foi lavado 2 vezes por 20 min em solução aquosa de 2% de Triton X-100 e incubado em tampão de ativação composto por 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 5mM CaCl₂ por 16 h a 37°C. A seguir, o gel foi corado com Coomassie blue R250 (Bio Rad). As proteínas com atividades gelatinolíticas foram observadas como bandas negativas.

Para quantificação das atividades enzimáticas, os géis foram escaneados no Scanner Model GS-700 Imaging Densitometer (Bio Rad) e as bandas analisadas com auxílio do programa Molecular Analyst™ (Bio Rad). O valor da densidade óptica foi calculado levando em consideração a área e a intensidade de cada banda. A normalização foi realizada dividindo o valor da densidade óptica da banda correspondendo a MMP-2 pelo número de células. O resultado final dos experimentos foi apresentado como a porcentagem de estimulação frente ao controle negativo.

4.10. Caracterização de MMP-2

A caracterização da banda com atividade gelatinolítica com massa molecular de ~72 kDa identificada em todos os nossos ensaios como sendo MMP-2 foi realizada por meio de incubação com 1,10-fenantrolina (Sigma), um inibidor específico de MMPs, e por imunoprecipitação com anticorpos específicos contra MMP-2. Para incubação com 1,10-fenantrolina, o sobrenadante de uma das amostras deste estudo foi submetido a enzimografia

em duplicata, sendo que após a lavagem com Triton X-100, as canaletas foram repartidas e uma das amostras foi incubada com tampão de ativação e a outra com tampão de ativação contendo 1mM de 1,10-fenantrolina.

Para o ensaio de imunoprecipitação, uma das amostras foi incubada com anticorpos monoclonais anti-MMP-2 humanos (The Binding Site, England) na diluição de 1/50 por 16 h a 4°C e agitação constante. Os imunocomplexos foram precipitados pela adição de 50 µl de proteína A-Sepharose (Sigma) por 1 h à temperatura de 4°C. Depois de lavar 3 vezes o material não-específico adsorvido pela Sepharose com PBS acrescido de 1% de Tween-20, o material imunoprecipitado foi eluído em tampão de amostra não redutor e analisado por zimografia.

4.11. Análise Estatística

Quando apropriado, análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey foi realizada. Em nossas comparações, $p < 0,05$ foi indicativo de significância estatística.

5. Resultados

5.1. Caracterização das células superexpressando Smad7

Após a transfecção dos plasmídeos contendo o gene Smad7 e seleção de clones resistentes a gentamicina, nós avaliamos por ensaios de WB os níveis de expressão de Smad 7. O experimento demonstrou que os níveis da proteína Smad 7 se encontravam intensamente aumentados nas células de GN transfectadas com o plasmídeo contendo o gene de interesse, demonstrando que a reação teve êxito (Fig. 2). Como controle, utilizamos células sem

transfecção de nenhum plasmídeo (linhagem GN) e células transfectadas com o plasmídeo vazio (linhagem GN-Controle). Com a obtenção das células superexpressado Smad 7, realizamos a reação de ELISA para a quantificação de TGF- β 1. Os níveis de TGF- β 1 foram significativamente elevados em todas as linhagens celulares cultivadas com 200ng/ml CsA em comparação com as células não tratadas (Fig. 3). Estes resultados demonstram que a superexpressão de Smad 7 não interfere com indução de TGF- β 1 promovida por CsA. Por fim, para confirmar que a superexpressão de Smad 7 é capaz de bloquear a cascata de TGF- β 1, nós realizamos ensaios de WB para a forma fosforilada de Smad 2. Este ensaio confirmou que a superexpressão de Smad 7 inibe a fosforilação de Smad 2, bloqueando a cascata de ativação de TGF- β 1. Figura 4 apresenta um marcado aumento na fosforilação de Smad 2 nas linhagens controle (GN e GN-Controle) tratadas com CsA, enquanto no grupo GN-Smad 7 tratado com CsA, a forma fosforilada de Smad 2 apresentou-se em quantidade semelhante à dos grupos não tratados com a droga.

5.2. Influência da superexpressão de Smad 7 na proliferação celular controlada por CsA

A comparação do potencial proliferativo das linhagens celulares tratadas com CsA foi inicialmente realizada através da construção de curvas de crescimento celular. O número de células em cada well foi determinado pelo método de coloração com azul de toluidina. Como esperado, durante os experimentos foi verificado que a proliferação celular foi tempo dependente em todas as linhagens utilizadas. A partir do 7º dia, CsA induziu significativamente a proliferação das linhagens celulares de GN ($p < 0,001$) e GN contendo o

plasmídeo controle (GN-Controle) ($p < 0,01$). O mesmo não ocorreu com a linhagem de GN superexpressando Smad 7 (GN-Smad 7) que manteve o crescimento celular, porém não apresentou diferenças significativas entre o grupo tratado e não tratado com CsA (Tabela 1). A partir deste resultado podemos observar dois fatores: (1) CsA induz a proliferação de linhagens celulares de GN, e (2) frisar a hipótese de que a superexpressão de Smad 7 em células de GN é efetivo no bloqueio da proliferação celular induzida por CsA, provavelmente por competir com Smad 2 pelos receptores transmembrânicos ativados por TGF- β 1.

Para confirmar os dados obtidos na curva de proliferação celular foram realizados ensaios de incorporação de BrdU, com a linhagem celular superexpressando Smad 7 e com as linhagens controle. Os resultados obtidos confirmaram que CsA significativamente induz a proliferação celular de células de GN e que a superexpressão de Smad 7 inibe este efeito (Fig. 5).

5.3. Influência da superexpressão de Smad 7 na produção de MMP-2 controlada por CsA

Com o objetivo de analisar o efeito de CsA na atividade de MMP-2 sintetizada pela linhagem celular superexpressando Smad 7 em comparação com a linhagem celular transfectada com o plasmídeo controle a linhagem celular de GN (célula parental), ensaios zimográficos foram realizados. A normalização foi realizada dividindo o valor da densidade óptica da banda correspondendo a MMP-2 pelo número total de células do well e o número de células presentes em cada well foi determinado pelo método de coloração com azul de toluidina. Após normalização, verificamos que a redução da atividade

de MMP-2 foi estatisticamente significativa entre as linhagens GN ($p < 0,01$) e GN-Controle ($p < 0,05$) tratadas com CsA em comparação com seus controles, mas não houve redução significativa da atividade de MMP-2 entre as células GN-Smad 7 tratadas com CsA (Fig. 6A e 6B). Os dados sugerem que a superexpressão do gene Smad 7 atua diminuindo ou até mesmo inibindo a ação de TGF- β 1, que provocaria a diminuição da atividade de MMP-2, como visto nas linhagens celulares utilizadas como controle. A confirmação da origem desta banda foi realizada por inibição com 1,10-fenantrolina e por ensaio de imunoprecipitação utilizando anticorpos específicos para contra MMP-2, seguido por enzimografia. Como revelado na Fig. 6C a banda com 72 kDa é MMP-2. Para confirmar estes resultados, a quantificação de MMP-2 foi também realizada por ELISA. Como revelado pela Figura 7, CsA inibiu significativamente a produção de MMP-2 pelas linhagens celulares controle, enquanto a superexpressão de Smad 7 parcialmente bloqueou este evento.

5.4. Influência da superexpressão de Smad 7 na produção de colágeno tipo I controlada por CsA

Outra característica que está presente no aumento gengival induzido por CsA é a maior produção de colágeno pelos fibroblastos gengivais. Para caracterizar a produção de colágeno tipo I dos clones de fibroblastos das 3 linhagens que estamos trabalhando, nós empregamos o ensaio de ELISA, utilizando anticorpos anti-colágeno tipo I humano conjugado à biotina. Figura 8 ilustra a produção de colágeno tipo I pelas 3 linhagens de fibroblastos. A produção de colágeno tipo I pelas linhagens GN e GN-Controle apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados e não

tratados com 200 ng/ml CsA, enquanto que na linhagem de GN-Smad 7 não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos tratado e não tratado, sugerindo que a superexpressão de Smad 7 bloqueia a atividade de TGF- β 1 e retoma a níveis normais a produção de colágeno tipo I por fibroblastos gengivais.

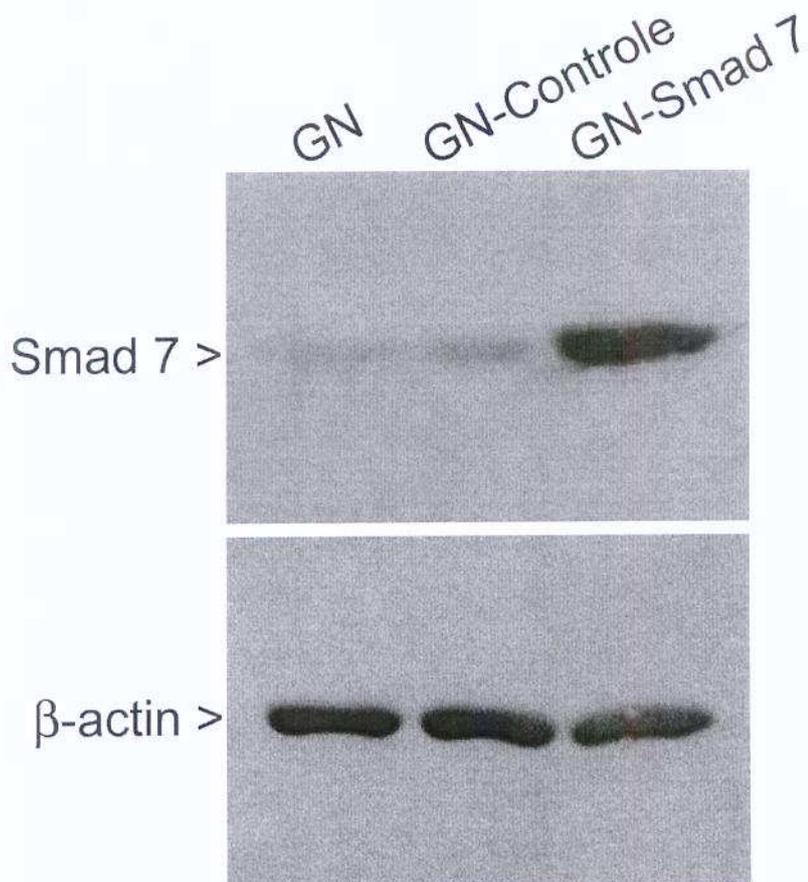


Figura 2. Clones da linhagem celular GN1 utilizados neste estudo. Reação de WB representativa demonstrando a superexpressão de Smad 7. GN: células parental, GN-Control: células transfectadas com vetor vazio e GN-Smad 7: células transfectadas com o vetor contendo a seqüência completa do cDNA humano do gene Smad 7.

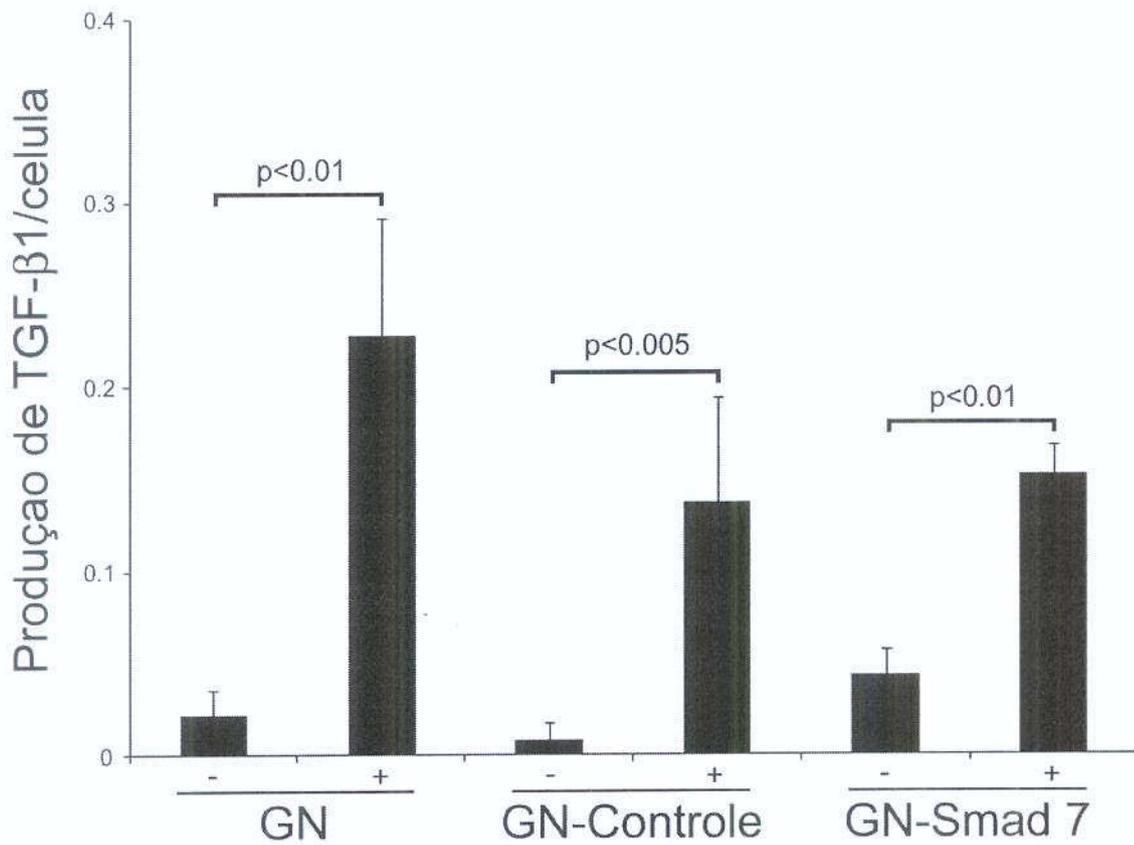


Figura 3. Produção de TGF- β 1 é induzida por CsA nos clones celulares deste estudo. Células foram cultivadas com CsA e a produção de TGF- β 1 foi quantificada por ELISA. Em todos os clones celulares, a produção de TGF- β 1 foi significativamente induzida pelo tratamento com CsA. Símbolos - e + representam a presença ou não de 200 ng/ml de CsA.

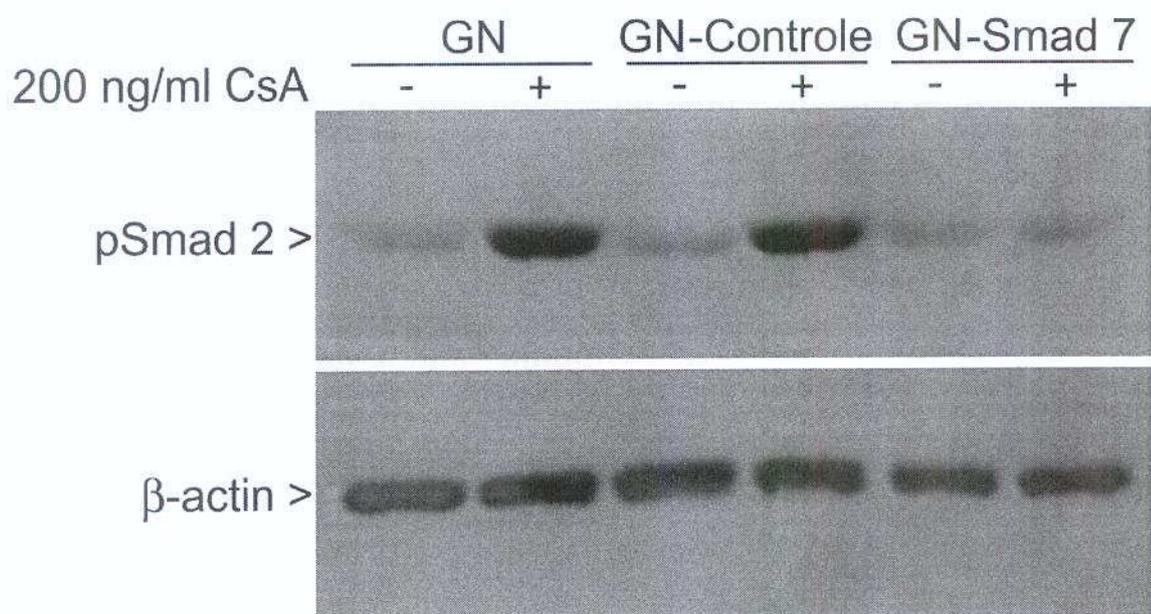


Figura 4. Superexpressão de Smad 7 bloqueia a fosforilação de Smad 2. Clones foram cultivados na presença de 200 ng/ml de CsA e a fosforilação de Smad 2 foi analisada por WB, mostrando que apesar de a produção de TGF- β 1 ter se mantido elevada, sua atividade foi inibida pela superexpressão de Smad 7.

Tabela 1. Superexpressão de Smad 7 previne a indução da proliferação celular promovida por CsA em culturas celulares de fibroblastos gengivais. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 2 experimentos. Células foram cultivadas em DMEM acrescido em 2% de FBS (grupo controle) ou com DMEM acrescido em 2% de FBS e 200 ng/ml de CsA (grupo CsA) por 11 dias. A determinação das populações celulares ocorreram nos dias 3, 5, 7, 9 e 11. Todas as linhagens celulares apresentaram um crescimento celular dependente do tempo, entretanto foi demonstrada uma maior proliferação celular dos grupos GN + CsA e GN-Controle + CsA em relação a seu controle a partir do 7º dia de contagem, que se manteve até o 11º dia de contagem. A linhagem celular superexpressando Smad 7 não apresentou diferença significativa entre o grupo tratado e não tratado com CsA. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

	Dia 3 (x10 ⁴)	Dia 5 (x10 ⁴)	Dia 7 (x10 ⁴)	Dia 9 (x10 ⁴)	Dia 11 (x10 ⁴)
GN	1,28 \pm 0,10	3,30 \pm 0,11	5,47 \pm 0,42	7,81 \pm 0,89	12,14 \pm 0,58
GN + CsA	1,47 \pm 0,12	3,79 \pm 0,40	10,19 \pm 1,05	14,0 \pm 2,38	17,42 \pm 0,56
GN-Controle	2,08 \pm 0,21	5,0 \pm 0,22	8,13 \pm 0,52	10,25 \pm 0,26	12,81 \pm 0,60
GN-Controle + CsA	2,11 \pm 0,14	6,36 \pm 0,56	10,95 \pm 0,91	18,95 \pm 0,38	18,61 \pm 1,30
GN-Sd7	1,82 \pm 0,22	5,37 \pm 0,84	7,0 \pm 0,39	11,29 \pm 0,75	12 \pm 0,49
GN-Sd7 + CsA	1,89 \pm 0,17	4,28 \pm 0,39	8,33 \pm 0,84	11,26 \pm 0,48	13,53 \pm 0,17

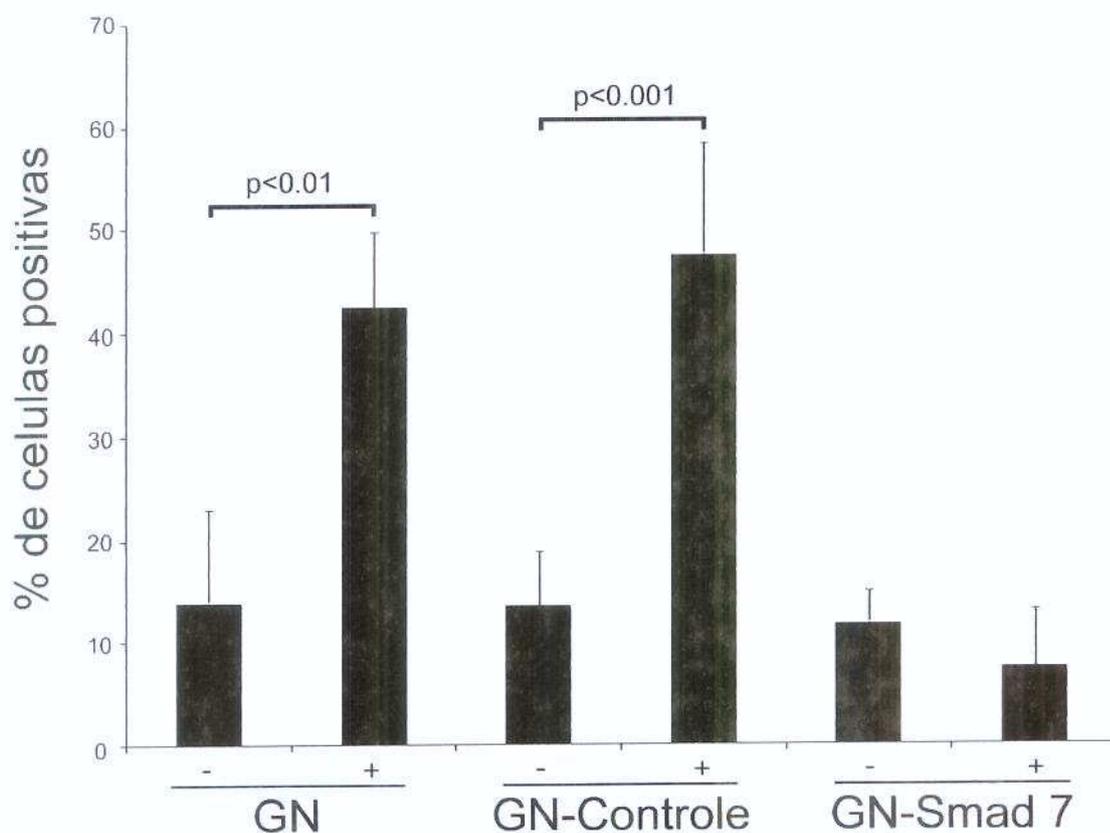


Figura 5. Superexpressão de Smad 7 inibe a proliferação celular induzida por CsA. Linhagens celulares foram cultivadas na presença de BrdU e as células em proliferação foram reveladas por imuno-histoquímica. CsA induziu significativamente a proliferação das linhagens GN e GN-Controle. Por outro lado, não houve diferença significativa na capacidade proliferativa da linhagem GN-Smad 7 tratada ou não com CsA. Símbolos – e + representam a presença ou não de 200 ng/ml de CsA.

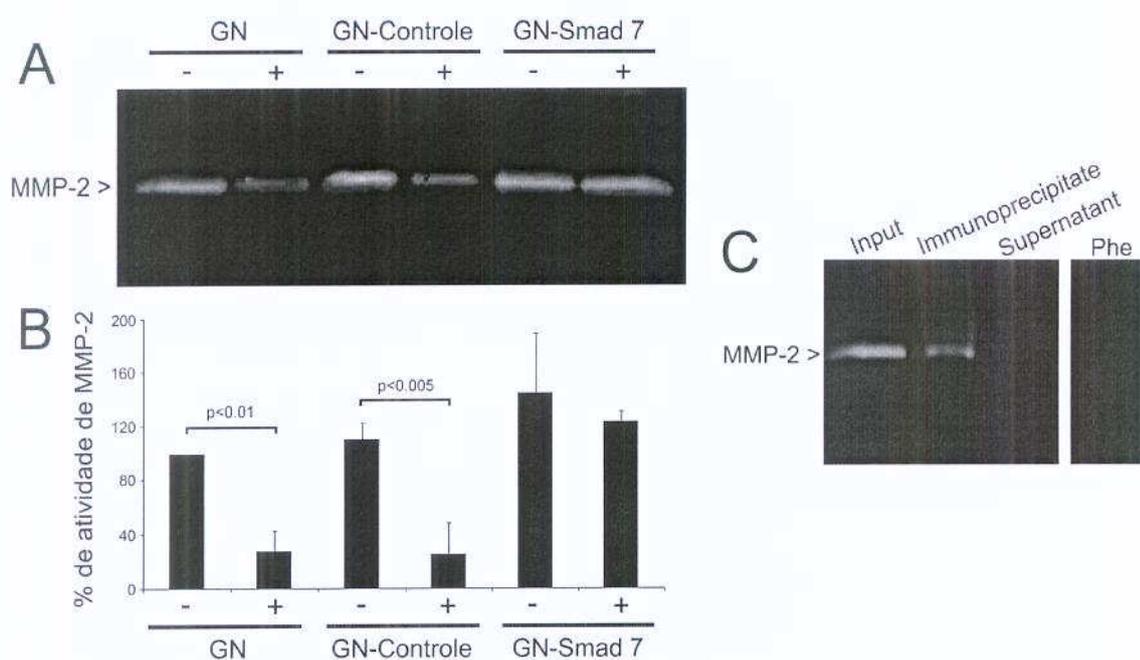


Figura 6. Superexpressão de Smad 7 bloqueia o efeito de CsA na inibição da atividade de MMP-2. **(A)** Análise zimográfica representativa da atividade de MMP-2. A visualização das bandas de MMP-2 demonstra uma diminuição da atividade desta proteína nas linhagens GN e GN-Controle quando tratadas com CsA. **(B)** Análise densitométrica dos ensaios zimográficos. A atividade de MMP-2 foi significativamente inibida por CsA nas linhagens GN e GN-Controle, mas não na linhagem GN-Smad 7 **(C)** Caracterização de MMP-2. Sobrenadante da linhagem de GN foi submetido à reação de imunoprecipitação com anticorpos anti-MMP-2, seguido por ensaio zimográfico. A canaleta indicada como Immunoprecipitate representa a atividade do imunoprecipitado e a canaleta indicada como Supernatant representa o meio de cultura após imunoprecipitação. Controle representa a amostra sem nenhum tratamento. A canaleta Phe corresponde ao sobrenadante que foi incubado na presença de 1 mM de 1,10-fenantrolina, um inibidor específico de MMPs.

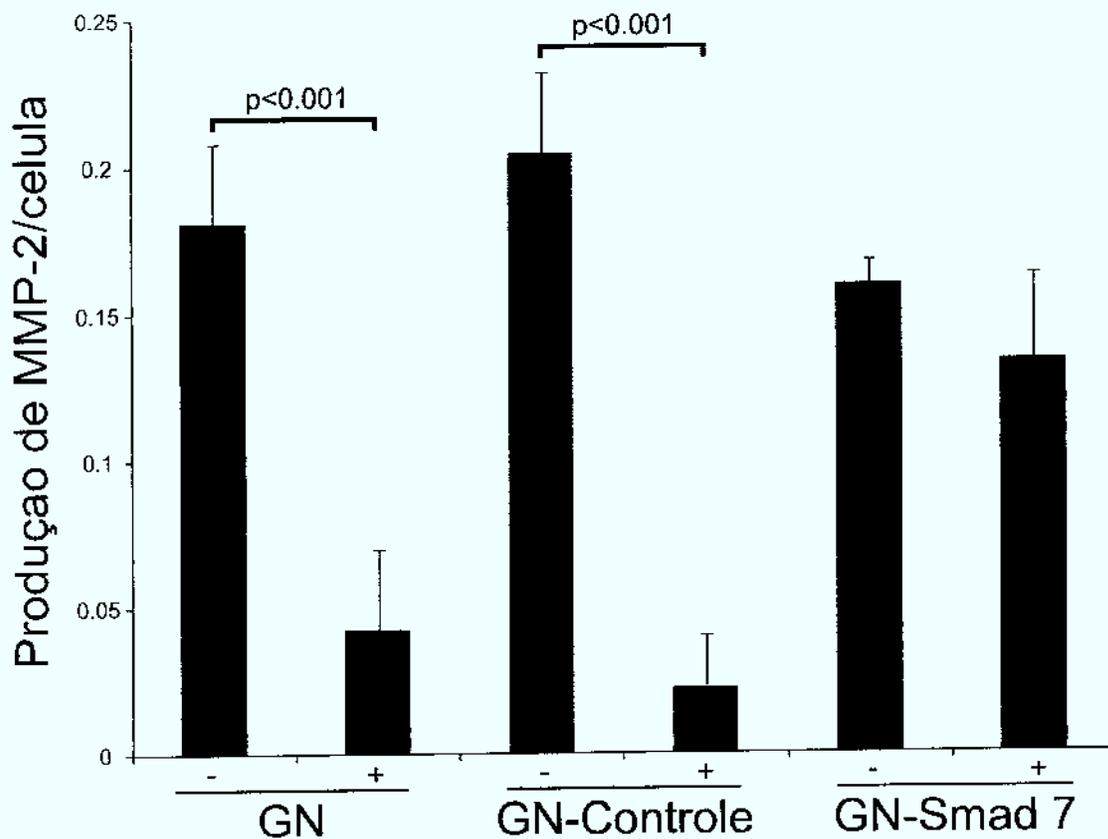


Figura 7. Superexpressão de Smad 7 inibe o efeito de CsA na inibição da produção de MMP-2 por fibroblastos gengivais. Para confirmar os resultados obtidos pelo ensaio zimográfico, células foram cultivadas na presença de CsA e a produção de MMP-2 foi quantificada por ELISA. A produção de MMP-2 foi significativamente inibida por CsA nos clones GN e GN-Controle, mas não na linhagem celular superexpressando Smad 7. Símbolos – e + representam a presença ou não de 200 ng/ml de CsA.

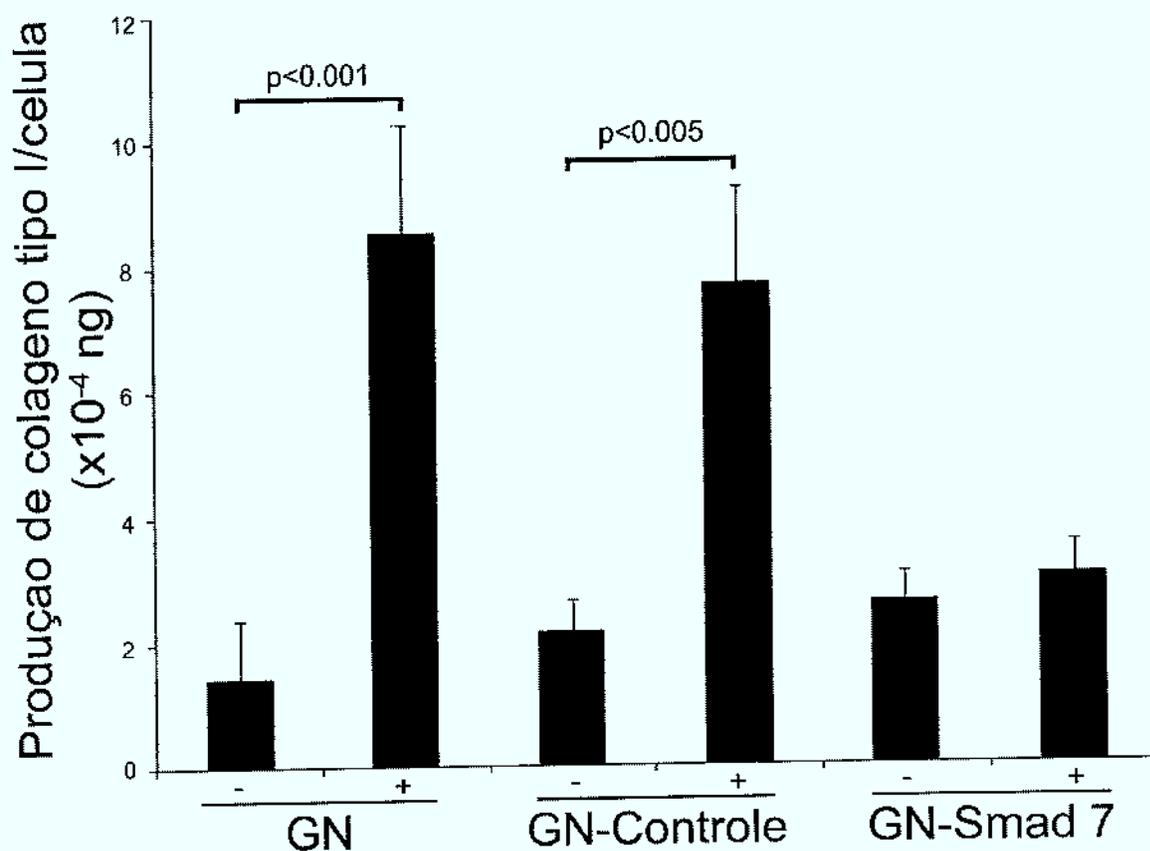


Figura 8. Superexpressão de Smad 7 bloqueia a indução de CsA na produção de colágeno tipo I. Células foram cultivadas na presença de CsA por 24 h, seguida pela quantificação de de colágeno tipo I. CsA induziu significativamente a produção de colágeno tipo I nas linhagens controle, enquanto que não foi capaz de induzir tal efeito nas linhagens superexpressando Smad 7. Símbolos – e + representam a presença ou não de 200 ng/ml de CsA.

6. Discussão

A descoberta da droga imunossupressora CsA liderou um grande avanço para o prognóstico dos pacientes transplantados. Apesar dos efeitos benéficos na prevenção da rejeição do transplantes, a mortalidade por doenças cardiovasculares e renais é significativamente maior em pacientes em tratamento com CsA comparado com a população normal (Lucey et al., 2005). Isto é conseqüência dos graves e comuns efeitos colaterais associados ao uso da droga, incluindo hipertensão, nefrotoxicidade e acúmulo de tecido conjuntivo fibroso (Rezzani, 2004). Outros efeitos colaterais indesejáveis, porém em menor quantidade, são, por exemplo, a indução de neoplasias, incluindo linfomas, sarcomas de Kaposi e carcinomas espinocelulares. Limitando-se a área odontológica, encontra-se o aumento gengival (Ciavarella et al., 2007). Uma revisão dos estudos publicados no assunto sugere uma incidência geral de aproximadamente 30% dos pacientes que fazem uso deste medicamento. (Sobral et al., 2007). Entretanto, há uma grande variabilidade na incidência e na gravidade do aumento gengival induzido por CsA, que parecem ser dependentes da dosagem e tempo de utilização da droga, controle de placa bacteriana, níveis de inflamação gengival, idade do paciente, tipo de órgão transplantado, susceptibilidade genética do indivíduo e capacidade de metabolismo da droga (Vescovi et al., 2005., Wright et al., 2001).

Já foi demonstrado que CsA altera os processos de metabolismo e/ou catabolismo do colágeno (McCulloch et al., 2004). Outras características presentes no aumento gengival como crescimento celular, produção de citocinas e fatores de crescimento, atividade fagocitária, expressão de MMP-2 e seus inibidores teciduais (TIMPs) têm sido estudadas em culturas celulares

de GN tratadas com CsA (McCulloch et al., 2004; Chae et al., 2006; Cotrim et al., 2003). Pesquisas *in vivo* e *in vitro* sugerem que os efeitos colaterais associados ao uso de CsA são decorrentes da capacidade da droga estimular a expressão de TGF- β 1 (Cotrim et al., 2002; Cotrim et al., 2003). Estudos realizados em nosso laboratório com culturas celulares 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 à patogênese do aumento gengival induzido por CsA (Cotrim et al., 2002). Foi demonstrado também que o efeito de CsA na indução da proliferação celular é dependente de TGF- β 1, visto que estudos realizados por Cotrim et al. (2003), por meio do bloqueio de TGF- β 1 com oligonucleotídeos antisense, previu o efeito de CsA na estimulação da proliferação celular.

A ação de TGF- β 1 inicia com a ligação a receptores transmembrânicos (TGFRI e TGFRII). A interação ativa os mensageiros citoplasmáticos da cascata MAPK-p38 ou da cascata Smad, que é formada por 8 membros. Smad 2 e/ou Smad 3 quando ativados por TGF- β 1 através de fosforilação, se associam com Smad 4 e são translocadas para o núcleo. No núcleo, os complexos atuam como fatores de transcrição, iniciando a ativação de genes específicos ou indiretamente se associando a proteínas de ligação de DNA (Moustakas et al., 2001; Mehra e Wrana, 2002; Massague e Gomes, 2006). Por outro lado, Smad6 e Smad 7 possuem atividade inibitória na cascata de ativação de TGF- β 1 por competir com Smad 2 e Smad 3 pelos receptores transmembrânicos

ativados (Derynck e Zhang, 2003). Experimentos realizados em nosso laboratório demonstraram que o tratamento de culturas celulares de GN com interferon gama ($IFN\gamma$) reduz significativamente a atividade de TGF- β 1 na indução da transdiferenciação em miofibroblastos e na produção de colágeno tipo I por induzir a expressão de Smad 7 (Sobral et al., 2007). Então, superexpressão de Smad 7 é eficaz no bloqueio das atividades de TGF- β 1 e, portanto, pode ser importante na prevenção dos efeitos colaterais induzidos por TGF- β 1.

O propósito deste projeto foi obter culturas celulares de GN superexpressando o gene Smad 7 para determinar se esta proteína é capaz de diminuir os efeitos da super-indução de TGF- β 1 causada pelo uso de CsA. Nossos resultados confirmaram que o tratamento com CsA na dosagem de 200 ng/ml, o equivalente sérico de pacientes que fazem uso da droga, aumenta a proliferação celular, induz a síntese de colágeno tipo I e inibe a atividade de MMP-2 por culturas celulares de GN. Em contrapartida, a superexpressão de Smad 7 bloqueiou estes eventos induzidos por CsA. Tais resultados ocorreram provavelmente porque a grande quantidade de Smad 7 inibiu a cascata de ativação de TGF- β 1 por competir pelos receptores transmembrânicos ativados (Derynck e Zhang, 2003.), impedindo que ocorra a fosforilação de Smad 2. Recentemente, Wang et al. (2007) demonstraram que a transfecção de Smad 7 em miofibroblastos cardíacos de ratos resultou em uma inibição da fosforilação de Smad 2 induzida por TGF- β 1 e um aumento na expressão de MMP-2. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a modulação negativa da ação de TGF- β 1 por meio da superexpressão de Smad 7 pode contribuir para a menor

proliferação celular, menor produção de colágeno e maior produção de MMP-2 em culturas celulares de GN tratadas com CsA, representando uma nova opção terapêutica ainda inexplorada para casos de aumento gengival.

7. Conclusões

1. O tratamento de culturas celulares de GN com CsA em concentrações de 200 ng/ml estimulou a proliferação celular, induziu a produção de colágeno tipo I e inibiu a atividade de MMP-2.

2. A superexpressão de Smad 7 em culturas celulares de GN bloqueou o efeito de CsA na proliferação celular, síntese de colágeno tipo I e atividade de MMP-2.

8. Referências Bibliográficas

1. 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.
2. Bartold PM: Regulation of human gingival fibroblast growth and synthetic activity by cyclosporine-A in vitro. *J periodontal Res.* 1989; 24(5): 314-321.
3. 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.
4. Bolzani G, Della Coletta R, 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.

5. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H: Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions*. 1976; 6(4): 468-475.
6. Bostrom A, Bharath H, Saulewicz A, Narayanan AS: Cyclosporin A effects signaling events differentially in human gingival fibroblasts. *J Dent Res*. 2005; 84(6): 532-536.
7. 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.
8. 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.
9. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004; 22(4): 233-241.
10. 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 gingival in rats. *J periodontol*. 2005; 76(12): 2267-2275.
11. 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 Pral Cir Bucal*. 2007; 12(1): E19-25.
12. Coletta RD, Almeida OP, Graner E, Page RC, Bozzo L: Differential proliferation of fibroblasts cultured from hereditary gingival fibromatosis and normal gingiva. *J Periodontal Res*. 1998; 33(8): 469-75.

13. Coletta RD, Christensen K, Reichenberger KJ, Lamb J, Micomonaco D, Huang L, Wolf DM, Müller-Tidow C, Golub TR, Kawakami K, Ford HL: The Six1 homeoprotein stimulates trimorigenesis by reactivation of cyclin A1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(17): 6478-83.
14. Colwell AS, Krummel TM, Longaker MT, Loreza HP: Fetal and adult fibroblasts have similar TGF-beta-mediated, Smad- dependent signaling pathways. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117(7): 2277-2283.
15. Cotrim P, 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.
16. 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.
17. Derynck R, Zhang YE: Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling. *Nature* 2003; 425(6958):577-584.
18. Dongari-Bagtzoglou A: Drug associated gingival enlargement. *J Periodontol* 2004; 75(10): 1424-1431.
19. Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB: Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983; 80(12): 3676-3680.
20. 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.

21. Gerards AH, Landewé RBM, Prins APA, Bruijn GAW, Goei Thè HS, Laan RFJM, et al. Cyclosporin A monotherapy versus cyclosporine A and methotrexate combination therapy in patients with early rheumatoid arthritis: a double blind randomized placebo controlled trial. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62(4): 291-296
22. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S: Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci.* 2002; 7:d793-807.
23. Goviden R, Bhoola KD: Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther.* 2003; 98(2): 257-265.
24. Guaré RO, Franco VB: Gingival hyperplasia in children: Use of anticonvulsants and oral hygiene. *Rev Odontol Univ São Paulo*, 1998 12(1) 39-45.
25. 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.
26. Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Gref 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.
27. Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Matimoto K, Lagman M, Shimbo T, Suthanthiran M: Cyclosporine: induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature.* 1999, 397(6719): 530-534.
28. Kahan BD: Cyclosporine: a revolution in transplantation. *Transplant Proc.* 1999; 31(1-2A): 14S-15S.

29. 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.
30. Kucich U, Rosenbloom JC, Herrick DJ, Hamilton AD, Sehti 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.
31. Lucey MR, Abdelmalek MF, Gagliardi R, Granger D, Holt C, Kam I, Klintmalm G, Langnas A, Shetty K, Tzakis A, Woodle ES : A comparison of tacrolimus and cyclosporine in liver transplantation: effects on renal function and cardiovascular risk status. *Am J Transplant.* 2005 May;5(5):1111-9.
32. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67: 753-791.
33. Massague J, Gomes RR: The logic of TGF-beta signaling. *FEBS Lett* 2006; 580(12): 2811-2820.
34. McCulloch CA. Drug-induced fibrosis: interference with intracellular collagen degradation pathway. *Curr Opin Drug Discov. Devel.* 2004; 7(5): 720-4.
35. McDonald JW, Feagan BG, Jewell D, Brynskov J, Stange EF, MacDonald JK. Cyclosporine for induction of remission in Crohn's. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005; 18(2): CD000297.
36. Mehra A, Wrana JL: TGF-beta and Smad signal transduction pathway. *Biochem Cell Biol* 2002; 80(5): 605-622.

37. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH: Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt24): 4359-4369.
38. O'Kane S, Ferguson MW: Transforming growth factor beta and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997; 29(1): 63-78.
39. 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. *J Eur Dermatol Venereol.* 2006; 20(6): 702-706
40. 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.
41. Rezzani R: Cyclosporine A and adverse effects on organs: histochemical studies. *Prog Histochem Cytochem.* 2004;39(2):85-128. Review
42. Rezzani R: Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: the morphological and immunohistochemical studies. *Histopathol.* 2006; 21(3): 3001-316.
43. 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.
44. Scragg MA, Ferreira LR. Evaluation of different staining procedures for the quantification of fibroblasts cultured in 96-well plates. *Anal Biochem.* 1991 Oct;198(1):80-5.
45. Seymour RA, Jacobs DJ: Cyclosporin and the gingival tissues. *J Clin Periodontol.* 1992; 19(1): 1-11.

46. Seymour RA: Effects of medications on the periodontal tissues in health and disease. *Periodontol* 2000.2006; 40: 120-129.
47. 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.
48. Sobral LM, Montan PF, Martelli-Júnior H, Graner E, Coletta RD: Oposite effects PF TGF-beta1 and INF-gamma on transdifferentiation of myofibroblasts in human gingival cell cultures. *J Clin Periodontol* 2007; 34(5): 397-406.
49. 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.
50. Trakman PC, Kantarci A: Connective tissue metabolism and gingival overgrowth. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15(3): 165-175.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. Wang P, Heitman J: The cyclophilins. *Genome Biol.* 2005; 6(7): 226.
55. Wang XG, Yu H, Chen Q, Zhao ZH, Zhang ZG, Guo MY: Changes of fibronectin and type IV collagen expression in cultured rat mesangial cells transfected with Smad 2 vector. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2005 Feb;34(2):97-100. Chinese.
56. Wright HJ, Chapple IL, Matthews JB: TGF-beta isoforms and TGF-beta receptors in drug-induced and hereditary gingival overgrowth. *J Oral Pathol Med.* 2001 May;30(5):281-9.
57. Wright G, Welbury RR, Hosey MT: Cyclosporin-induced gingival overgrowth in children. *Int J Pediatr Dent.* 2005; 15(6): 403-411.
58. 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.

