



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Patrick Franz Montan

Orientador(a): Ricardo Della Coletta

Ano de Conclusão do Curso: 2009

TCC 468

A handwritten signature in black ink, likely belonging to Ricardo Della Coletta, the supervisor.

Assinatura do (a) Orientador(a)

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



**SUPER-EXPRESSÃO DE SMAD 7 BLOQUEIA A TRANSDIFERENCIAÇÃO
DE MIOFIBROBLASTOS INDUZIDA POR TGF- β 1 EM CULTURAS
CELULARES DE GENGIVA NORMAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Piracicaba

(2009)

Unidade FOP/UNICAMP	
N. Chamada 1.8525	
.....	
Vol.	Ex.
Tombo BC/	

2.5.787120

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

M762s	Montan, Patrick Franz. Super-expressão de SMAD 7 bloqueia a transdiferenciação de miofibroblastos induzida por TGF-β1 em culturas celulares de gengiva normal. / Patrick Franz Montan. – Piracicaba, SP: [s.n.], 2008. 28f. Orientador: Ricardo Della Coletta. Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Fator de crescimento transformante - beta 1. 2. Fibroblasto. 3. Fibromatose gengival. I. Della Coletta, Ricardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
-------	---

Dedico este trabalho

À Deus,

Pela força e coragem durante toda esta caminhada e por sempre guiar meus passos;

À minha mãe e ao meu pai,

Que sempre me apoiaram e me confortaram quando necessário;

Ao meu irmão Henry e minha irmã Michelle,

Pelo amor, incentivo e apoio absoluto em mais uma etapa de minha vida;

A minha namorada Marina,

Pelo amor incondicional, apoio, conselhos e palpites;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, por ser um professor exemplar estando sempre à disposição quando precisei e por não ter poupado esforços para ensinar;

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus;

Aos meus pais, Edson e Margot, a minha irmã, Michelle, e ao meu irmão, Henry, pelo incentivo, esforço e ajuda na realização deste trabalho, pois sem eles jamais chegaria onde cheguei;

A minha namorada Marina, por estar sempre ao meu lado quando precisei.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pela oportunidade da realização deste trabalho;

Ao PIBIC, pelo apoio financeiro concedido, o qual foi de extrema importância;

Ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, pela orientação, ensinamento e compreensão durante a minha formação;

A pós-graduanda Lays Martin Sobral, pela ajuda e ensinamentos;

Ao meu grande amigo e companheiro de horas difíceis, Rafael Araújo, por tudo que passamos juntos;

Aos meus muitos amigos que sempre me ajudaram e me ouviram quando precisei de um ombro amigo, que jamais serão esquecidos e pelos quais tenho um enorme carinho;

Aos meus colegas de curso da turma 49 que estudaram e conviveram comigo;

À todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente, contribuindo para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Ilustrações	07
Lista de Palavras e Abreviaturas em Latim	08
1. Resumo	09
2. Introdução	10
3. Objetivos	12
4. Materiais e Métodos	12
4.1. Culturas Celulares	12
4.2. Transfecção	12
4.3. Caracterização da Super-Expressão de Smad 7 na Linhagem Celular de GN	14
4.3.1. RT-PCR para Smad7	14
4.3.2. Western Blot para Smad 7	15
4.4. Tratamento com TGF-β1	15
4.5. ELISA para Colágeno Tipo I	16
4.6. ELISA para CTGF	17
4.7. Análise Estatística	17
5. Resultados	17
5.1. Obtenção das Culturas Gengivais Super-Expressando Smad 7	17
5.2. Super-Expressão de Smad 7 Bloqueia a Transdiferenciação de Miofibroblastos Promovida pelo Tratamento com TGF-β1	18
5.3. Super-Expressão de Smad 7 Reduz a Produção de Colágeno Tipo I e a Expressão de CTGF Promovida pelo Tratamento com TGF-β1	19
7. Conclusões	26
8. Referências Bibliográficas	26

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	20
Figura 2	21
Figura 3	22
Figura 4	23
Figura 5	24
Figura 6	25

LISTA DE PALAVRAS E ABREVIATURAS EM LATIM

GN = Gengiva Normal

IFN γ = Interferon γ

α -SMA = Isoforma α de Actina de Musculatura Lisa

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

CTGF = Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo

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

WB = Western Blot

MEC = Matriz Extracelular

MMPs = Metaloproteinases de Matriz

Elisa = Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

DMEM = Meio de Eagle modificado por Dulbecco.

cDNA = Ácido desoxirribonucléico complementar.

1. Resumo

Miofibroblastos são as principais células envolvidas em desordens fibróticas. O exato surgimento destas células permanece parcialmente desconhecido, porém inúmeros estudos apontam para TGF- β 1 como uma molécula chave para o desencadeamento a partir da transdiferenciação de fibroblastos ou da diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas. O objetivo deste estudo foi determinar se a super-expressão de Smad 7, um regulador negativo da atividade de TGF- β 1, poderia inibir a transdiferenciação de culturas celulares de GN em miofibroblastos. Com este intuito, uma cultura celular de GN foi estabelecida e forçada a super-expressar de forma estável a proteína humana Smad 7 ou o gene bacteriado CAT. Nossos resultados demonstraram que a super-expressão de Smad 7 bloqueou parcialmente a transdiferenciação de miofibroblastos induzida pelo tratamento com TGF- β 1, como revelado pela reduzida expressão de α -SMA, o principal marcador celular de miofibroblastos. Concomitantemente, células super-expressando Smad 7 e tratadas com TGF- β 1 apresentaram uma significativa redução na produção de colágeno tipo I e na expressão de CTGF comparado com as células controle. Os resultados deste estudo permitem concluir que a super-expressão de Smad 7 é eficaz no bloqueio da transdiferenciação de culturas celulares de GN em miofibroblastos induzida por TGF- β 1 e permite sugerir que a inibição da cascata de ativação de TGF- β 1 pode ser clinicamente efetiva no tratamento doenças fibróticas, incluindo as que afetam o tecido gengival.

2. Introdução

Miofibroblastos são células especializadas que exercem funções importantes em processos fibróticos através da síntese elevada de matriz extracelular, proteases e citocinas (1). Estas células apresentam um fenótipo híbrido, contendo características de fibroblastos e de células de musculatura lisa (2,3) e são caracterizadas pela expressão de α -SMA estando presentes de forma transiente em processos de reparo, aonde exercem papel importante na contração da ferida (1). Porém, quando persistentes são responsáveis pela formação de processos fibrosos, como nos casos dos quelóides e das fibroses renais, pulmonares e pancreáticas (4,5). Miofibroblastos são caracterizados por uma produção elevada de citocinas, incluindo TGF- β 1, MEC, particularmente colágeno, e uma síntese reduzida de MMPs, que são as principais enzimas responsáveis pela degradação da MEC (1). 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 (5,6,7) processo que se inicia com a aquisição de fibras do estresse compostas por actina citoplasmática e a produção de fibronectina celular (4).

Os mecanismos que desencadeiam a transdiferenciação dos miofibroblastos parecem desconhecidos, porém vários estudos demonstram um papel importante para TGF- β 1 neste processo (8,9). TGF- β 1 é uma citocina multifuncional pertencente à família TGF- β de polipeptídeos. 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 (10,11). Esta citocina regula vários eventos celulares como proliferação,

diferenciação, adesão, mobilidade, apoptose e resposta imunológica. O início da sinalização depende da ligação de TGF- β 1 aos seus receptores transmembrânicos (TGFR I e TGFR II), esta ligação ativa os mensageiros citoplasmáticos, Smad 2 e/ou Smad 3, que são fosforilizados e se ligam ao co-fator Smad 4, formando um complexo. Este complexo é translocado ao núcleo onde irá funcionar diretamente como fator de transcrição, aumentando a expressão de CTGF, ou indiretamente, associando-se a proteínas de ligação do DNA.

Em oposição aos efeitos de TGF- β 1, algumas citocinas inflamatórias demonstram um efeito inibitório na transdiferenciação dos fibroblastos. Após o tratamento de culturas celulares com a citocina inflamatória IFN γ , observou-se uma diminuição na expressão de α -SMA e colágeno tipo I (12,13). Simultaneamente, o tratamento com IFN γ induziu rapidamente a expressão de Smad 7, uma molécula que regula negativamente a atividade de TGF- β 1 impedindo a fosforilação do Smad 2 e Smad 3 e, conseqüentemente, inibindo a expressão de CTGF. IFN γ não alterou os níveis de Smad 6 e TGF- β 1 (14,15). Tendo em vista estes nossos resultados prévios, o objetivo deste projeto foi a determinar os efeitos da super-expressão de Smad 7 em culturas celulares de gengiva normal (GN). Para determinar os efeitos da super-expressão de Smad 7, clones celulares específicos de GN foram estabelecidos através da transfecção estável de plasmídeos contendo a seqüência completa do cDNA humano de Smad 7 ou plasmídeos controle expressando o gene bacteriano CAT. A detecção do marcador específico de miofibroblastos α -SMA foi realizada por RT-PCR e western blot. O ensaio de ELISA para colágeno tipo I e CTGF foi utilizado para avaliar a atividade metabólica dos miofibroblastos.

3. Objetivos

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da super-expressão de Smad 7 na prevenção da transdiferenciação de culturas celulares de GN em miofibroblastos induzida por TGF- β 1. Em adição, nós avaliamos o efeito da super-expressão na produção de colágeno tipo I e CTGF.

4. Materiais e Métodos

4.1. Culturas Celulares

A linhagem celular de GN usada neste estudo foi previamente obtida pela técnica do explante (16), e encontrava-se armazenada 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 (Invitrogen), contendo 10% de soro fetal bovino, 100 μ g/ml de penicilina, 120 μ g/ml de sulfato de kanamicina a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Todos os experimentos foram realizados usando-se células entre a terceira e décima passagens.

4.2. Transfecção

O método escolhido para avaliar o efeito da super-expressão da proteína Smad 7 em células de GN foi o de estabelecer uma linhagem celular expressando, de forma estável, o plasmídeo pcDNA3.1 contendo o cDNA completo do gene humano Smad 7 fusionado a um pequeno fragmento do proto-oncogene c-Myc (pcDNA3.1-Myc-Smad 7), gentilmente cedido pelo Dr. Azeddine Atfi, da Universidade de Paris, França (17). Como controle, nós utilizamos o mesmo plasmídeo contendo o gene CAT no local de Myc-Smad 7. Ambos os plasmídeos contêm a sequência genética responsável por conferir resistência ao antibiótico puromicina, permitindo desta maneira a seleção das células transfectadas.

Primeiro foi realizado a transformação dos plasmídeos. 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 de cultura LB-ágar contendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina (Invitrogen). Para isto, 50 μl de uma solução de bactérias foram misturados com 100 ng de cada plasmídeo e mantidos no gelo por 30 min. Transcorrido este período, as células foram mantidas a temperatura de 42°C por 1 min e rapidamente resfriadas no gelo por 2 min. Em seguida, 450 μl do meio de cultura LB líquido foi adicionado a cada tubo e colocado sobre agitação por 1 h a 37°C. As bactérias foram semeadas em placas de cultura contendo LB-ágar e 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina nos volumes de 10, 100 e 200 μl e incubadas por 16 h a 37°C. Seguindo a etapa de transformação, as células foram expandidas através da seleção de uma única colônia de cada plasmídeo em 5 ml de meio LB líquido por 16 h a 37°C. Os plasmídeos de expressão foram purificados com o Kit PureLink HiPure Plasmid Miniprep (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Pureza e concentração foram determinadas pela leitura da absorbância de uma amostra com concentração de 1% nos comprimentos de onda 260 e 280 nm (espectrofotômetro Genesys 2, Spectronic Inst., Rochester, NY, EUA).

Após a expansão dos plasmídeos foi feita a transfecção. Resumidamente, células foram cultivadas a uma confluência de 50-60% e foram tratadas por 24 h com uma mistura de 1 ml de meio de cultura sem soro fetal bovino ou antibióticos contendo 3 μg de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) e 1 μg de plasmídeo. Após o período de transfecção, as células foram cultivadas com meio de cultura até confluência. Após este período as células foram incubadas com meio de cultura contendo o antibiótico de seleção. As células sobreviventes foram cultivadas e

testadas quanto da super-expressão do gene de interesse e estocadas em nitrogênio líquido.

4.3. Caracterização da Super-Expressão de Smad 7 na Linhagem Celular de GN.

A caracterização da superexpressão foi realizada por ensaios de análise da transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e por western blot.

4.3.1. RT-PCR para Smad 7

RNA foi extraído das culturas celulares com o reagente TRIzol, como recomendado pelo fabricante (Invitrogen). 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 µg de RNA total foram transcritos reversamente a cDNA adicionando a mistura 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. Os primers foram para Smad 7 sense 5' CGTCCACGGCTGCTGCATAA 3' e antisense 5' ATGCTGTGCCTTCCTCCGCT 3'. Os produtos de PCR foram corados com brometo de etídeo e separados eletroforéticamente em gel de 1% agarose/TAE (tampão Tris-Ácido acético-EDTA).

4.3.2. Western Blot para Smad 7

Culturas celulares foram coletadas, lavadas em PBS e incubadas com tampão de lise sem detergentes (10 mM Tris-HCl pH 8, 0,01 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM NEM, 1 mM DTT, 10 µg/ml STI, 1 mg/ml leupeptina e 1 mg/ml aprotinina), associado a lise mecânica através da passagem da solução por seringas de 1 ml. 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 eletroforeticamente em gel 10% SDS-PAGE. 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 incubado com anticorpos anti-Smad 7 (Santa Cruz) por 2 h. Após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase e reveladas com o kit de quimioluminescência seguindo normas do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL, EUA). A membrana foi então envolta por plástico e exposta ao filme radiográfico.

4.4. Tratamento com TGF-β1

Após o estabelecimento das células expressando estavelmente Smad 7 deu-se início ao tratamento com TGF-β1. TGF-β1 liofilizado (R&D Systems, Mineapólis, MN, EUA) foi dissolvido em meio de cultura, aliquotado e armazenado a -80°C. Os clones de GN controle e super-expressando Smad 7 foram tratados com 10 ng/ml de TGF-β1 em meio de cultura contendo 0,1% de FBS durante 3 dias. Como controle, as células foram cultivadas da mesma maneira, mas sem a presença da citocina. Em seguida, o

efeito na transdiferenciação em miofibroblastos foi analisado por ensaios de RT-PCR e western blot com anticorpos específicos contra α -SMA, como descrito por Sobral et. al. (2007). O efeito na produção de colágeno tipo I e CTGF foi determinado por ELISA.

4.5. ELISA para Colágeno Tipo I

Para determinar a atividade dos miofibroblastos, a produção de colágeno tipo I foi avaliada por ELISA. Resumidamente, 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 μ l 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.

4.6. ELISA para CTGF

Sobrenadante celular foi coletado e as células para determinar o número de células por poço. Em triplicata, 200 µl do sobrenadante foi utilizado para sensibilizar placas de 96-poços por 2 h a temperatura ambiente. Seguindo sensibilização, 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-CTGF (R&D Systems) na diluição de 1:200 por 2 h. Após outra etapa de lavagem, foi adicionado anticorpo anti-human IgG conjugado à peroxidase (GE Healthcare) na concentração de 1:1.000 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).

4.7. Análise Estatística

Diferenças na produção de colágeno tipo I e CTGF entre os clones celulares foram avaliadas por teste T de Student com $p \leq 0,05$, como indicador de significância.

5. Resultados e Discussão

5.1. Obtenção das Culturas Gengivais super-expressando Smad 7

Smad 7 é um regulador negativo da atividade de TGF- β 1 por competir com Smad 2 e Smad 3 pelo sítio de ligação ao receptor transmembrânico ativado (18). Para avaliar o efeito da super-expressão de Smad 7, uma linhagem celular de GN foi forçada a expressar de forma estável Smad 7 ou o gene bacteriano CAT. Para tanto foi feita a transfecção estável de plasmídeos contendo a sequência completa do cDNA

humano de Smad 7 ou plasmídeos controle expressando o gene bacteriano CAT. A caracterização dos clones foi inicialmente realizada por RT-PCR. Como controle da reação, nós analisamos a expressão de Smad 6, o outro membro da família Smad que também apresenta um papel na regulação negativa (bloqueio) da cascata de ativação de TGF- β 1 (14,15). Como esperado, a expressão de Smad 7 foi marcadamente maior das células transfectadas com o plasmídeo específico comparado com as células transfectadas com o plasmídeo controle. Em adição, não houve diferença no padrão de expressão de Smad 6 pelos clones celulares (Fig. 1). A confirmação da super-expressão de Smad 7 foi também realizada por ensaios de western blot. Figura 2 ilustra a super-expressão de Smad 7 nas células transfectadas com o plasmídeo específico. Estes resultados indicam que a transfecção foi efetiva, as células super-expressaram Smad7, porém sem alterar as características intrínsecas da célula, fato evidenciado pela não alteração do nível de expressão de Smad6 (Fig. 1).

5.2. Super-Expressão de Smad 7 Bloqueia a Transdiferenciação de Miofibroblastos Promovida pelo Tratamento com TGF- β 1

Miofibroblastos, as principais células envolvidas em desordens de origem fibrótica, são caracterizadas pela grande expressão α -SMA(1). Evidências recentes demonstram que os efeitos de TGF- β 1 na produção de MEC e na transdiferenciação de miofibroblastos são mediados por CTGF (18). Esta transdiferenciação ocorre quando, após a ligação do TGF- β 1 aos seus receptores transmembrânicos, Smad 2 e 3 são fosforilados e conjugados com Smad 4 (cofator), sendo então translocados para o núcleo aonde atuam diretamente como fatores de transcrição, ou indiretamente, associando-se a proteínas de ligação de DNA (19). Ao contrário do Smad 2 e Smad 3, Smad 6 e Smad 7 possuem uma atividade inibitória na cascata de ativação de TGF- β 1

(20). O bloqueio da cascata de ativação TGF- β 1 seria uma terapia interessante, no entanto, a falta de entendimento com relação às culturas gengivais limita qualquer ação terapêutica. Com o objetivo de melhor compreender este mecanismo, após a confirmação da super-expressão de Smad 7, os clones foram submetidos ao tratamento com TGF- β 1 em uma concentração de 20 ng/ml por um período de 72 h e o efeito na transdiferenciação de miofibroblastos foi analisado através do western blot. A análise de western blot demonstrou que a super-expressão de Smad 7 parcialmente preveniu a transdiferenciação de miofibroblastos induzida por TGF- β 1 (Fig. 3). Estes resultados foram confirmados pelos ensaios de RT-PCR que também demonstrou que os níveis de expressão de Smad 6 foram inalterados após o tratamento com TGF- β 1 (Fig. 4).

5.3. Super-Expressão de Smad 7 Reduz a Produção de Colágeno Tipo I e a Expressão de CTGF Promovida pelo Tratamento com TGF- β 1.

Estudos recentes demonstram o importante papel de TGF- β 1 na transdiferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e o papel de CTGF tem neste processo. Miofibroblastos, as principais células envolvidas em desordens inflamatórias, são caracterizadas pela grande produção MEC, principalmente colágeno (1). Com o intuito de avaliar os efeitos da superexpressão de Smad 7 nas células de culturas gengivais transfectadas, estas foram tratadas com TGF- β 1, substância que é conhecida por aumentar os níveis de expressão de colágeno tipo I e CTGF, em uma concentração de 20 ng/ml por um período de 72 h. Após o tratamento com TGF- β 1 as culturas celulares tiveram seu sobrenadante coletado e analisado pelo método de ELISA para colágeno tipo I e CTGF. Os resultados estão apresentados nas figuras 6 e 7. Em ambos os casos (TGF- β 1 e CTGF) houve uma diminuição substancial da

expressão quando comparamos as células superexpressando Smad 7 com as células controle expressando CAT. Estes resultados indicam que a superexpressão de Smad 7 pode ser efetiva no bloqueio no fenótipo miofibroblástico em culturas gengivais, podendo ser um alvo interessante no tratamento de desordens de origem fibrótica, porém um completo entendimento dos eventos envolvidos neste processo se fazem necessários antes de qualquer tentativa neste sentido.

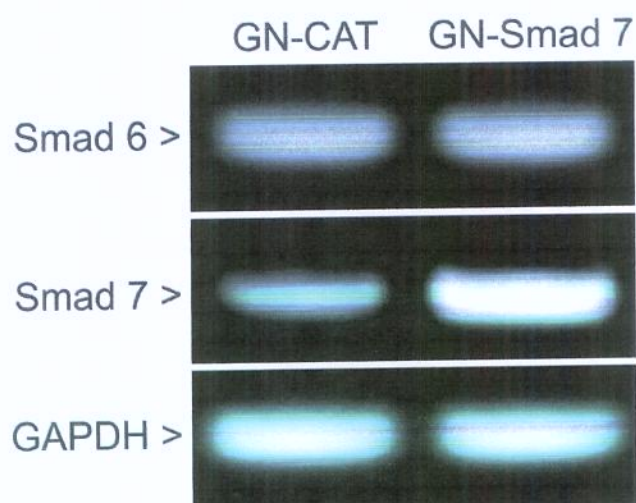


Figura 1. Caracterização do clones específicos. Análise por RT-PCR dos níveis de Smad 6 e Smad 7 nos clones celulares transfectados com o plasmídeo contendo o gene controle CAT e o gene Smad7. Este resultado demonstra que as células transfectadas com o plasmídeo contendo o gene Smad 7 apresentam uma expressão marcadamente maior de Smad 7 comparado com as células controle. A expressão de Smad 6 não foi modulada.

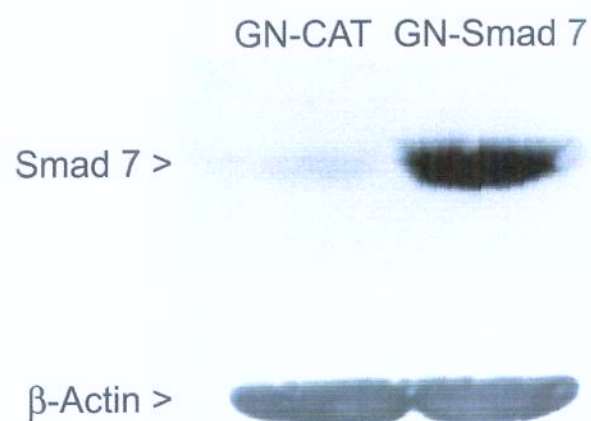


Figura 2. Análise por western blot dos clones específicos transfectados com o gene controle CAT e com o gene Smad 7. A reação de β -actina foi utilizada como controle. Este ensaio demonstrou que existe uma diferença marcante dos níveis de produção de Smad 7 das células transfectadas com o plasmídeo Smad 7 em comparação com plasmídeo controle.

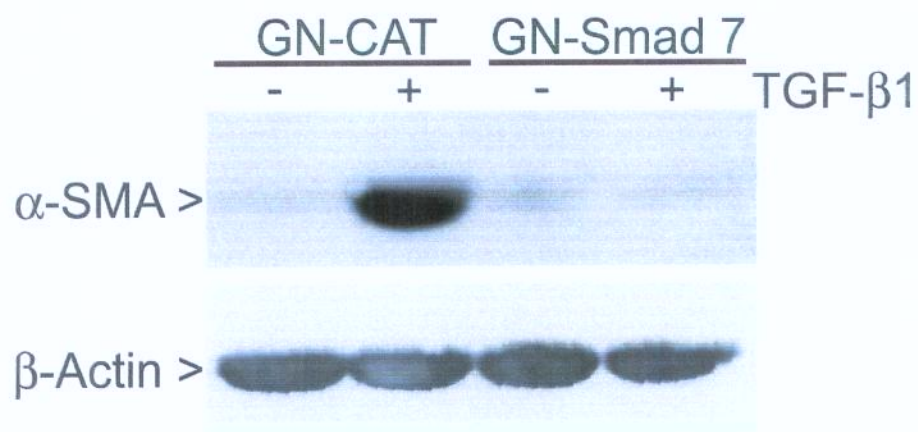


Figura 3. Análise por western blot demonstrando que a super-expressão de Smad 7 bloqueia a indução da transdiferenciação de fibroblastos gengivais em miofibroblastos induzida por TGF- β 1. Clones foram tratados com 20 ng/ml de TGF- β 1 e submetidos a análise de western blot com anticorpos específicos contra α -SMA e β -actina.

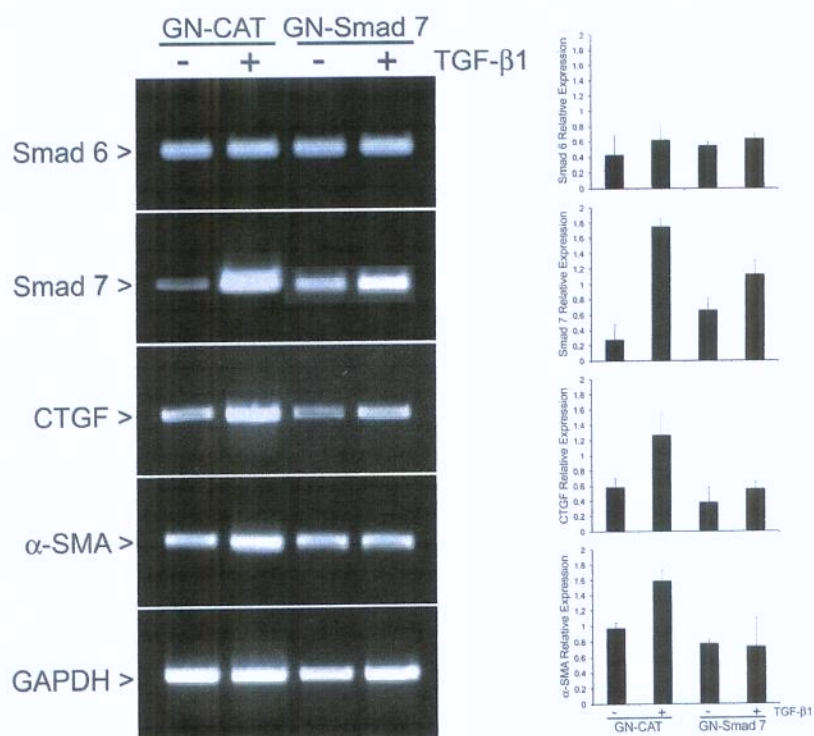


Figura 4. Super-expressão de Smad 7 inibe a transdiferenciação em miofibroblastos induzida por TGF- β 1. Clones tratados com TGF- β 1 por 3 dias foram coletados e submetidos a ensaios de RT-PCR com primers específico para Smad 6, Smad 7, CTGF, α -SMA e GAPDH, este último como controle da reação. Como antecipado, super-expressão de Smad 7 preveniu a transdiferenciação em miofibroblastos induzida por TGF- β 1. Simultaneamente, a super-expressão de Smad 7 bloqueou a ativação de CTGF associada com a cascata de sinalização de TGF- β 1.

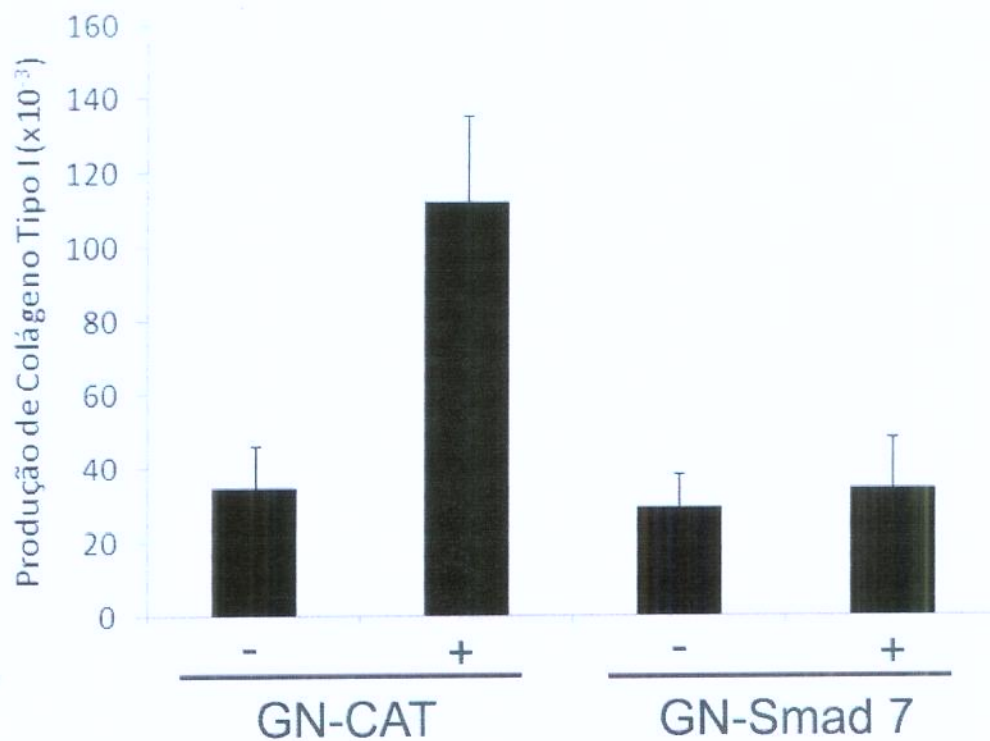


Figura 5. Efeito de TGF- β 1 na produção de colágeno tipo I pelas linhagens celulares super-expressando Smad 7. O tratamento com TGF- β 1 mostra que as células super-expressando Smad 7 tiveram uma produção reduzida de colágeno tipo I quando comparada a célula controle, que super-expressa o gene bacteriano CAT.

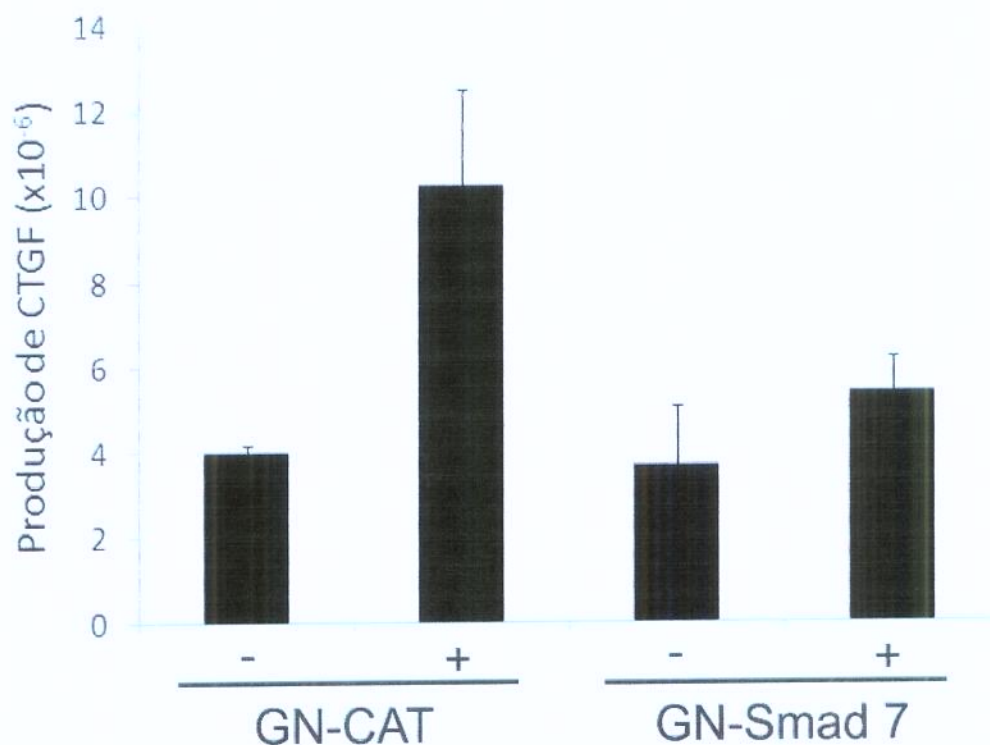


Figura 6. Efeito de TGF- β 1 na produção de CTGF pelas linhagens celulares super-expressando Smad 7. Após o tratamento com TGF- β 1 em uma concentração de 20 ng/ml por um período de 72 h, o sobrenadante foi coletado e analisado pelo método Elisa. O resultado demonstra que as células super-expressando Smad 7 tem uma produção marcadamente reduzida de CTGF quando comparada as células controle.

7. Conclusões

Os resultados deste estudo revelaram que o bloqueio da transdiferenciação das culturas celulares de GN em miofibroblastos exercido por Smad 7 é provavelmente mediado por uma inibição na cascata de ativação de TGF- β 1, tendo em vista que a transfecção com o plasmídeo contendo Smad 7 não alterou os níveis de Smad 6 e TGF- β 1. Nós observamos que culturas gengivais superexpressando Smad 7, quando tratadas com TGF- β 1, tem sua transdiferenciação bloqueada parcialmente, fato evidenciado pela redução na expressão de α -SMA e colágeno tipo I. Esta inibição é acompanhada por uma significativa inibição na expressão de CTGF, sugerindo que Smad 7 interferiu na cascata de sinalização, impedindo a transcrição de CTGF e bloqueou parcialmente a transdiferenciação das culturas de GN.

Os resultados deste estudo também permitem sugerir que a inibição da cascata de ativação de TGF- β 1 via super-expressão de Smad 7 pode ser clinicamente efetivo no tratamento de aumentos gengivais de origem fibrótica, porém nossa incompleta compreensão dos eventos envolvidos neste tratamento limitam a aplicação terapêutica deste tratamento.

8. Referências bibliográficas

1. Gabbiani, G. (2003) *J Pathol* **200**, 500-503
2. Desmouliere, A., Chaponnier, C., and Gabbiani, G. (2005) *Wound Repair Regen* **13**, 7-12.
3. Badid, C., et al., *Role of myofibroblasts during normal tissue repair and excessive scarring: interest of their assessment in nephropathies*. *Histol Histopathol*, 2000. **15**(1): p. 269-80.

4. Desmouliere, A., Guyot, C., and Gabbiani, G. (2004) *Int J Dev Biol* **48**, 509-517.
5. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA: Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. *Nat Rev Cell Biol*. 2002; 3(5):349-363.
6. Smith PC, Cáceres M, Martinez J. Induction of the myofibriblastic 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.
7. Bitu, C. C., Sobral, L. M., Kellermann, M. G., Martelli-Junior, H., Zecchin, K. G., Graner, E., and Coletta, R. D. (2006) *J Clin Periodontol* **33**, 393-400.
8. Fan JM, Ng YY, Hill PA, Nikolic-paterson DJ, Um W, Atkins RC, ET AL.: Transforming growth factor-beta regulates tubular ephitelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int* 1999; 56(4):1455-1467.
9. Petrov VV, Fagard RH, Lijinen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta 1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension*. 2002; 39(2):258-263.
10. Roberts AB, Anzano MA, Lmab LC, Smith JM, Sporn MMB. New classes of transforming growth factors potentiated by ephidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78(9):5339-5343.
11. Tucker RF, Volkenant ME, ranun EC, Moses HL. Comparison of intra and extracelular transforming growth factor from non-transformed and chemically transformed mouse embryo cells. *Câncer Res*. 1983; 43(4):1581-1586.
12. Sobral, L. M., Montan, P. F., Martelli-Junior, H., Graner, E., and Coletta, R. D. (2007) *J Clin Periodontol* **34**, 397-406.

13. 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 fibroblast cell line. *Int Immunopharmacol*. 2003;3(9):1273-1280.
14. Wahab, N. A., Weston, B. S. & Mason, R. M. (2005). Modulation of the TGFbeta/Smad signaling pathway in mesangial cells by CTGF/CCN2. *Exp Cell Res*, 307, 305-314.
15. Yamanaka, O., Ikeda, K., Saika, S., Miyazaki, K., Ooshima, A. & Ohnishi, Y. (2006). Gene transfer of Smad7 modulates injury-induced conjunctival wound healing in mice. *Mol Vis*, 12, 841-851.
16. Coletta, R. D., Almeida, O. P., Graner, E., Page, R. C., and Bozzo, L. (1998) *J Periodontal Res* **33**, 469-475.
17. Mazars, A., Lallemand, F., Prunier, C., Marais, J., Ferrand, N., Pessah, M., Cherqui, G., and Atfi, A. (2001) *J Biol Chem* **276**, 36797-36803.
18. Zhang, C., Meng, X., Zhu, Z., Liu, J., and Deng, A. (2004) *Cell Biol Int* **28**, 863-873.
19. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH: Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Biol* 2002; 80(5):605-622.
20. Derynck R, Zhang YE: Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling. *Nature* 2003; 425(6958):577-584.