UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

GLÁUCIA BOLZANI
Cirurgiã- dentista

"EFEITOS DA CICLOSPORINA-A NA PRODUÇÃO E ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES DE MATRIZ POR FIBROBLASTOS GENGIVAIS."

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Biologia e Patologia Buco-Dental.

Piracicaba
1999

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

GLÁUCIA BOLZANI
Cirurgiã- dentista

"EFEITOS DA CICLOSPORINA-A NA PRODUÇÃO E ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES DE MATRIZ POR FIBROBLASTOS GENGIVAIS."

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Biologia e Patologia Buco-Dental.

Este exemplar foi devidamente corrigido, de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 21/02/00

Assinatura do Orientador

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

Piracicaba
1999

IDADE B C
CHAMADA:
1/UNICAMP
B639e
Ex.
TOMBO BC/ 40841
PROC. 278/00
C [ ] D [X]
PREÇO 11,00
DATA 04/04/00
CPD

CM-00135163-8

Ficha Catalográfica

Bolzani, Gláucia.
B639e Efeitos da ciclosporina -A na produção e atividade de metaloproteinases de matriz por fibroblastos gengivais. / Gláucia Bolzani. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 1999.
127p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Edgard Graner.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Ciclosporina. 2. Proteinase. 3. Gengivas. 4. Hiperplasia. I. Graner, Edgard. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB / 8 – 6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.

UNICAMP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 17 de Novembro de 1999, considerou a candidata GLÁUCIA BOLZANI aprovada.

1. Prof. Dr. EDGARD GRANER _____

2. Prof. Dr. LUIS CARLOS SPOLIDÓRIO _____

3. Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA _____

1. *Dedique tempo para trabalhar: é o preço do triunfo.*

2. *Dedique tempo para pensar: é a fonte do poder.*

3. *Dedique tempo para recrear: é o segredo da juventude.*

4. *Dedique tempo para ler: é a base do conhecimento.*

5. *Dedique tempo para adorar: é o caminho da reverência.*

6. *Dedique tempo para com os amigos:: é o caminho da felicidade.*

7. *Dedique tempo para amar e ser amado: é o gérmen criador de endorfinas (substância da alegria e bem estar).*

8. *Dedique tempo para sonhar: eleva a alma às estrelas.*

9. *Dedique tempo para rir: alivia as tensões da vida.*

10. *Dedique tempo para planejar: é o segredo de como encontrar tempo para as nove coisas anteriores.*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, **VERA e NELSON**, *meus primeiros e verdadeiros mestres, a quem tudo devo, pelos seus sacrifícios, amor e dedicação para a minha formação moral e intelectual, pelos exemplos de dignidade e honradez, os quais sempre me ajudaram a vencer os desafios da vida, seguindo seus exemplos.*

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais:

À minha irmã **VERA ALICE**, pelos quilômetros de estrada compartilhada, pelo incentivo, confiança, compreensão que com amor soube transmitir apoio paciente nas jornadas difíceis para a realização deste trabalho, cuja extensão só pode ser entendida quando alguém tenta tal tarefa.

À minha irmã **SANDRA**, pela interferência suave, compreensiva e companheira neste trabalho, minha gratidão.

Aos meus irmãos **NELSINHO** e **ATÍLIO**, pelo afeto fraternal e cooperação para minha formação profissional, que sempre torceram pelo meu êxito.

Ao avô **DINO**, pela presença constante no desabrochar dos netos à procura de aperfeiçoamento profissional.

Ao **RICARDO AUGUSTO**, pelo carinho e paciência constante, que entendeu o significado dos momentos onde a prioridade nem sempre era ele.

A **DEUS**, por estar sempre presente na minha vida, iluminando e direcionando meu caminho.

Ao ***Prof. Dr. Edgard Graner****, por sua segura orientação científica, amizade, incentivo, paciência e exemplos de vida que marcaram-me fortemente durante a confecção desta tese. Pelas horas despendidas de seu lazer, por seu espírito de ajuda, pela partilha de todos seus conhecimentos, pelas mais diversas contribuições, esperando ter correspondido em tudo, a minha admiração, o meu respeito e os meus eternos agradecimentos.*

Ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta,** que me passou valiosos e seguros ensinamentos, meus agradecimentos pelo incentivo constante e sugestões na elaboração desta tese.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas na pessoa de seu diretor **PROF. DR. ANTONIO WILSON SALLUM**, pelo apoio aos cursos de pós-graduação oferecidos à instituição

À **Profa. Dra ALTAIR ANTONINHA DEL CURY**, coordenadora geral dos cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

À **Profa. DARCY de OLIVEIRA. TOSELLO**, coordenadora do Curso de Pós-Graduação do Curso de Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas

Ao **Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA**, professor titular e responsável pela disciplina de Patologia Bucal da FOP- UNICAMP, pela credibilidade e compreensão durante a elaboração deste trabalho.

Ao Prof. **JOÃO CARLOS BACARELLI**, da PUCCAMP, por ter me iniciado na pesquisa científica e estimulado na carreira universitária.

Aos professores da área de Patologia, **prof. LOURENÇO BOZZO** e da área de Semiologia, **prof. MÁRCIO A. LOPES**, **prof. OSVALDO Di HIPÓLITO JÚNIOR**, pela amizade, oportunidade e incentivo à minha formação e, em especial, ao **prof. JACKS JORGE JÚNIOR**, que, mesmo longe continua contribuindo para nosso desempenho, meu muito obrigada.

Aos técnicos do Laboratório de Patologia da FOP- Unicamp, **ANA CRISTINA DO AMARAL GODOY** e **ADRIANO LUIS MARTINS**, pelo respaldo técnico e colaboração recebida durante a execução da fase experimental e documentação fotográfica.

Aos funcionários da Disciplina de Patologia nas pessoas de **MARIA HELENA DE VASCONCELOS PERON** e **ROSA MARIA FORNASIER**, pelos inúmeros auxílios durante todo o curso e pela amizade saudável.

Ao estagiário **SÉRGIO AMARAL de CAMPOS**, *pelo auxílio inicial no manuseio e cuidados com os animais.*

A bibliotecária **MARILENE GIRELLO**, *pela correção das Referências Bibliográficas.*

Aos amigos da disciplina de Patologia da FOP UNICAMP, **HANNAH, RUI, ADDAH, CHRISTIANE, PAOLA, CRISTINA, BETE, RENATA, ROGÉRIO, HALBERT, NADJA, PAULO, JÚNIOR, PABLO, FÁBIO (MINEIRO), FÁBIO (CARIOCA)** *e* **ROBERTO**, *pelo companheirismo, amizade, convívio marcado pela alegria, seriedade e responsabilidade, minha eterna lembrança que, com certeza, deixaram recordações que trarão saudades.*

Aos colegas de pós graduação de curso de Biologia e Patologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP, pelo convívio durante essa etapa de nossas carreiras e pela solidariedade sempre recebida.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, uma vez que o mesmo não é individual mas coletivo. Trata-se de um esforço conjunto de inúmeras pessoas, que possam ter ficado no anonimato, mas nem por isso deixaram de dar sua parcela de contribuição para a concretização desta tese.

À

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela contribuição financeira e confiança providas nesse projeto (Processo nº 97/06364-0).

SUMÁRIO

LISTA de ABREVIATURAS 01

1- RESUMO 02

2- ABSTRACT 04

3- INTRODUÇÃO 06

4- REVISÃO DE LITERATURA 08

4.1-Ciclosporina-A 08

4.2- Metaloproteinases de Matriz (MMPs) 14

4.3-Colágeno 20

4.4-Aumento Gengival Associado ao Tratamento com Ciclosporina-A 22

4.4.1-Aspectos Clínicos 23

4.4.2- Mecanismo de Ação da CSA 25

4.5-Gengiva de Ratos 31

4.5.1-Gengiva de Molares de Rato 31

4.5.2-Gengiva de Incisivos de Rato 32

5- PROPOSISÃO 34

6- MATERIAIS E MÉTODOS 35

6.1- Animais 35

6.2- Análise da Atividade das MMPs na Gengiva de Ratos Tratados com CSA 36

6.2-1- Obtenção das MMPs 36

6.2-2- Zimogramas com Meio de Cultura Condicionado pela Gengiva de Ratos 37

6.2-3- Inativação das MMPs 38

6.3- Células 38

6.3-1- Cultura Primária de Fibroblastos Gengivais de Ratos 38

6.3-2- Cultura Primária de Fibroblastos Gengivais Humanos 39

6.3-3- Tratamento dos Fibroblastos Gengivais em Cultura com CSA 39

6.3-4- Imunoprecipitação 40

6.3-5- Zimogramas com Meio de Cultura Obtido de Fibroblastos Gengivais 41

6.4- Western Blots 42

6.4-1- Detecção de MMPs Secretadas para o Meio de Cultura 42

6.4-2- Extratos Protéicos Totais de Fibroblastos 43

6.4-3- Detecção de Colágeno Tipo I 44

6.5- Extração e Análise de Colágeno Tipo I 45

6.5-1- Extração de Colágeno Tipo I de Caudas de Ratos 45

6.5-2- Extração de Colágeno Tipo I da Gengiva de Molares e Incisivos de Ratos Tratados ou não com CSA 46

7- RESULTADOS 47

7.1- Atividade Gelatinolítica do Tecido gengival de Ratos 49

7.2-Análise do Colágeno tipo I extraído da Gengiva de Ratos 52

7.3-Atividade Gelatinolítica dos Meios de Cultura de Fibroblastos Tratados com CSA 55

7.4-Análise da Produção das MMPs por fibroblastos Gengivais em Cultura 61

7.5-Análise da Atividade Caseinolítica do Meio de Cultura de Fibroblastos Gengivais 82

7.6-Detecção de Colágeno tipo I em Culturas Primárias de Fibroblastos tratados com CSA 84

7.7-Imunoprecipitação 86

8- DISCUSSÃO 89

9- CONCLUSÕES 98

10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 99

LISTA DE ABREVIATURAS

BCiP = 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato

BSA = albumina sérica bovina

CSA = ciclosprorina-A

DAB = di-amino benzidina

D.O.= densidade óptica

GCN = gengiva clinicamente normal

IL-1 = interleucina-1

IL-2 = interleucina-2

IL-6 = interleucina-6

kDa = quilodalton (do inglês "kilodalton)

MMP = metaloproteinase de matriz (do inglês "Matrix metalloproteinase")

NBT = nitro blue tetrazolium

PBS = salina tamponada com fosfato

PBST = salina tamponada com fosfato + 0,05% Tween 20

PGE-2 = prostaglandina E-2

PM = peso molecular

PMSF = fluoreto de fenilmetilsulfonil

SDS = sódio dodecil sulfato

SDS - PAGE = eletroforese em géis de poliacrilamida - SDS

TBST = salina tamponada com Tris + 0,05% Tween 20

1-RESUMO

A ciclosporina-A (CSA) é uma droga imunossupressora, seletiva para linfócitos T, muito usada atualmente na prevenção da rejeição de transplantes de órgãos e de medula óssea. Dentre os efeitos colaterais da CSA está o aumento gengival, caracterizado principalmente por um acúmulo excessivo de matriz extracelular. Como o mecanismo através do qual a CSA atua na regulação da síntese e degradação de matriz extracelular ainda não é conhecido, o objetivo do presente trabalho foi estudar seu efeito sobre a produção das metaloproteinases de matriz (MMPs) e do colágeno tipo I por fibroblastos gengivais, através de eletroforese em SDS - PAGE, zimografia e western blots. Para isto, ratos foram tratados diariamente com 10mg/kg de peso corporal de CSA por via subcutânea durante 30 e 60 dias, sendo que todos os animais tratados desenvolveram aumento gengival. A atividade gelatinolítica dos meios de cultura condicionados com os fragmentos de tecido gengival foi menor nos animais tratados com CSA que nos grupos controle. A atividade enzimática também foi inibida no meio de cultura condicionado por fibroblastos tratados com CSA. A análise através de western blots demonstrou que a produção de colagenase de fibroblastos (MMP-1) e de estromelisina-1 (MMP-3) por 7

diferentes linhagens de fibroblastos gengivais humanos em cultura também foi significativamente reduzida pela ação da CSA. Com relação ao colágeno tipo I, foi detectada uma maior quantidade desta glicoproteína na matriz extracelular da gengiva dos ratos tratados com CSA, em comparação com os controles, assim como em culturas primárias de fibroblastos gengivais tratados com esta droga.

Palavras chave: ciclosporina-A, metaloproteinases de matriz, aumento gengival e colágeno tipo I.

2-ABSTRACT:

"Effects of ciclosporin- A (CSA) on the production and activity of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts."

Cyclosporin A (CyA) is an immunossupressant drug used to prevent rejection of allograft transplants and in the management of various autoimmune diseases that acts blocking interleukin-2 synthesis by CD4+lymphocytes. The gingival overgrowth affecting the attached gingiva of 25-80% of the treated patients, is a frequent side effect of CyA treatment in the oral cavity. The aim of the present work was to evaluate the effect of CyA on matrix metalloproteinases (MMPs) synthesis and activity as well as type I collagen production by gingival fibroblasts. Wistar rats were treated daily with 10mg/kg of body weight of CyA during 30 and 60 days to induce gingival overgrowth. After these periods, the gingival tissue was removed and used to study MMPs activity in zymographic assays as well as type I collagen deposition by SDS-PAGE. Primary cultures of fibroblasts from rats and 7 different clinically healthy human gingiva were established and used to analyze secretion and activity of MMPs in the culture medium. The cells were treated with different concentrations

of CyA and analised by zymographic assays and western blots. The gelatinolytic activity of MMP-2 was strongly reduced by CyA treatment, both "in vivo" and in cell culture. In addition, the relative amounts of MMP-1 and MMP-3 in the culture medium was significanty reduced by CyA treatment and the amount of type I collagen in the hyperplastic rat gingival tissue was higher than in control animals. Our data clearly showed that CyA strongly reduces the activity and production of MMPs by gingival fibroblasts, probably leading to the accumulation of type I collagen and other macromolecules in the gingival connective tissue.

Key words: cyclosporin-A, matrix metalloproteinases, gingival overgrowth and type I collagen.

INTRODUÇÃO

3-INTRODUÇÃO

O exato mecanismo através do qual a CSA provoca aumento gengival ainda não foi esclarecido. Desequilíbrios entre a síntese e a degradação de matriz extracelular podem favorecer o acúmulo de colágeno e outras macromoléculas na matriz extracelular do tecido gengival (HASSEL et al., 1982; TIPTON et al., 1991).

Alguns autores atribuem o aumento gengival ao aumento do número de fibroblastos (WYSOCKI et al., 1983), enquanto que outros demonstraram aumento na quantidade de colágeno extracelular (MARIOTTI et al., 1998). Também já foi relatada a existência de sub-populações heterogêneas de fibroblastos, o que de certa forma justificaria a susceptibilidade individual à CSA (DELILIERS et al., 1986; McGAW et al., 1988; TIPTON et al., 1991). Recentemente, nosso grupo demonstrou que fibroblastos gengivais de pacientes portadores de fibromatose gengival hereditária apresentam um índice de proliferação significativamente maior que fibroblastos provenientes de pacientes normais (COLETTA et al., 1998).

Um aumento na síntese de colágeno pode ser resultado de redução na produção e/ou atividade das MMPs ou aumento na produção de inibidores teciduais das metaloproteinases de matriz (TIMPs), equilíbrio que pode estar alterado nos crescimentos

gengivais induzidos por drogas ou de caráter hereditário. Entretanto, a proliferação preferencial de uma população de fibroblastos metabolicamente ativa, também pode causar um aumento gengival, neste caso resultado de uma interação entre a droga e seus metabólitos com fibroblastos gengivais suscetíveis (SEYMOUR e JACOBS,1992).

O presente trabalho descreve a influência do tratamento com CSA sobre a atividade gelatinolítica e produção das MMPs por fibroblastos gengivais, correlacionando-as com a quantidade de colágeno tipo I depositado na matriz extracelular.

REVISÃO DA LITERATURA

4-REVISÃO DA LITERATURA

4.1 - CICLOSPORINA - A (CSA)

A CSA é um pequeno peptídeo lipofílico descrito na década de setenta por BOREL, formado por onze aminoácidos de fórmula $C_{62}H_{111}O_{12}$ (PM = 1206,6 kDa) (figura I) e isolado de duas espécies de fungos encontrados na terra, o *Trichoderma polysporium rifai* e *Cylindrocarpo lucidum* (revisado por WISKOTT, 1983; DALEY e WYSOCKI, 1984). Quando descoberta, foi inicialmente utilizada como agente antifúngico, sendo produzida comercialmente a partir da cultura do fungo *Tolypocladium inflatum gans* (BOREL et al., 1976; KANITAKIS e THIVOLET, 1990; SEYMOUR e JACOBS, 1992).

Ela é um polipeptídeo cíclico, cuja ação é dependente de cálcio e que induz, de maneira específica e reversível, à inibição da IL-2 e várias outras citocinas, mais notadamente nos linfócitos T-helper (COLOMBANI et al., 1985; FAULDS et al., 1993). O efeito da CSA no fluxo de cálcio é controverso, tendo sido citado por HESS e COLOMBANI (1987) que a CSA não afeta o aumento de cálcio intracelular. Devido as suas propriedades imunossupressivas, a CSA é utilizada na profilaxia e tratamento da rejeição de transplantes.

Também é utilizada em vários outros tipos de doenças, como por exemplo, síndrome ocular aguda de Behçet, uveítes endógenas, psoríase, lúpus eritematoso, dermatites, artrite reumatóide, doença ativa de Crohn, síndrome nefrótica, cirrose biliar primária e diabetes mellitus tipo I (DALEY et al.,1986; SEYMOUR e JACOBS, 1992; FAULDS et al.,1993).

Lesões bucais como pênfigo vulgar e bolhoso e líquen plano também são tratados com esta droga (STARZL, 1983).

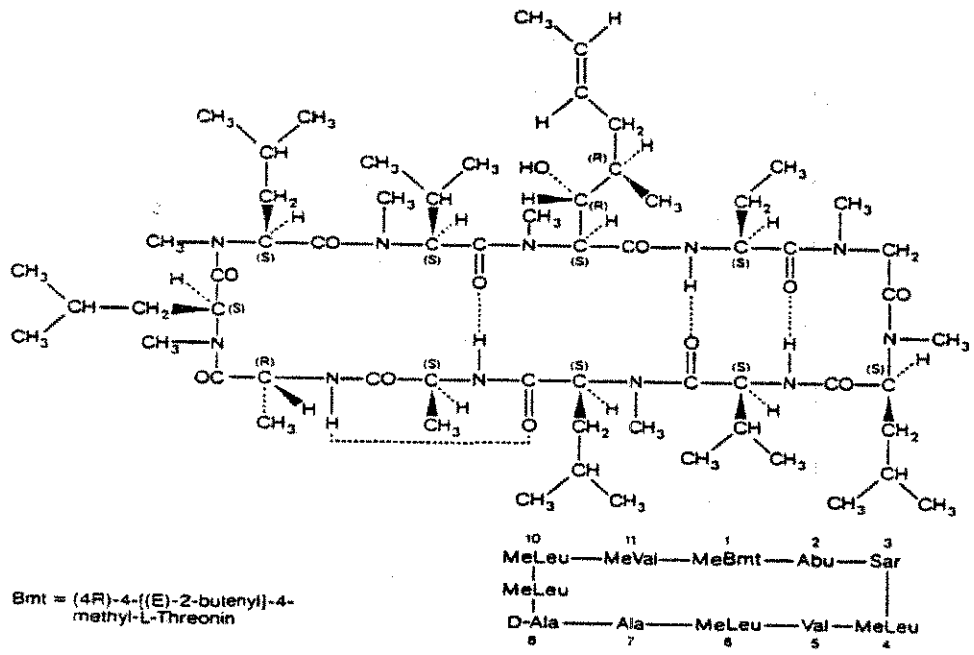

Figura I - Fórmula estrutural da CSA

A CSA é moderadamente bem absorvida pelo intestino e metabolizada pelo fígado, podendo apresentar como principais efeitos

colaterais nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e neurotoxicidade, além de hipertensão, síndrome hemolítica-urêmica, hipertricoses, aumento da incidência de trombos intravasculares, neoplasmas linfoproliferativos, e em um número significativo de casos aumento gengival (OTA e BRADLEY, 1983; GOLDMAN et al.,1985; O'VALLE et al.,1994). NABEL (1999), num estudo muito recente, mostrou que a CSA afeta diretamente o crescimento tumoral, podendo ser a responsável pelo aumento do risco de câncer em pacientes que fazem uso deste medicamento por um tempo longo.

A CSA tem uma vida média plasmática de aproximadamente 6 a 8 h, sendo processada no fígado em 14 metabólitos, dos quais apenas 09 têm sua estrutura determinada: 1, 8, 9, 10, 13, 16, 17, 18 e 21 (WENGER, 1990). Destes, 90% são excretados pelo fígado através da bile para as fezes e os 10% restantes pela urina. Menos do que 0,1% da droga é excretada em forma de molécula ativa (KAHAN, 1989; LEMAIRE et al., 1990; SEYMOUR e JACOBS, 1992).

Dentre as propriedades biológicas da CSA incluem-se atividade anti-parasítica, fungicida, anti-inflamatória e, principalmente, imunossupressora (BOREL e LAFFERTY, 1983; SEYMOUR e JACOBS, 1992). Nos pacientes transplantados, o tratamento imunossupressor visa inibir as células imunocompetentes ativadas, tornando possível a tolerância ao órgão recebido de um doador

estranho, bem como a preservação de sua função no organismo receptor. A inibição do sistema imunológico pela CSA é reversível com a interrupção do uso da droga (STEINMULLER, 1985; DALEY et al., 1986 KANITAKIS e THIVOLET, 1990).

A atividade imunossupressora da CSA está relacionada com sua ação seletiva sobre os linfócitos T CD4 positivos, onde inibe a síntese de IL-2 e de outros mediadores da resposta imunológica (KANITAKIS e THIVOLET, 1990) sem mielossupressão, permitindo que as outras células do sistema imune permaneçam intactas (KLAUSEN, 1991). Estas características biológicas desta droga desencadearam um grande número de estudos clínicos no tratamento de numerosos distúrbios imunológicos, principalmente na rejeição do transplante de órgãos (DALEY e WYSOCKI, 1984).

Do ponto de vista molecular, a CSA parece atuar devido à sua interação com um receptor citoplasmático solúvel, denominado de ciclofilina, uma proteína encontrada tanto em organismos procariontes como eucariontes, portanto, bastante conservada filogeneticamente. A principal isoforma de ciclofilina humana já está bem caracterizada bioquimicamente, apresentando uma massa molecular de 17,7 kDa e um ponto isoelétrico de 9,3 (SCHREIBER, 1991).

A complexa cadeia de eventos envolvidos na ativação dos linfócitos T dura alguns dias, sendo que a CSA atua durante as primeiras h deste processo. A estimulação dos receptores das células T por antígenos estranhos (apresentados ao linfócito pelo complexo de histocompatibilidade maior - MHC, na superfície de uma célula apresentadora de antígenos) resulta na ativação de uma via de transmissão de sinais através do citoplasma, que culmina com a ativação de fatores de transcrição específicos no núcleo do linfócito (fator nuclear das células T ativadas ou NF-AT). Estes fatores regulam a transcrição da IL-2, controlando sua síntese e secreção para o meio extracelular. A CSA inibe especificamente esta via de transmissão de sinais, impedindo a ligação do NF-AT às regiões regulatórias do gene que codifica a IL-2 (SCHREIBER, 1991). Outros mecanismos sugeridos para a ação da CSA são: redução no influxo de Ca^{++} intracelular e inibição da síntese e secreção de IL-1, produzida pelos macrófagos (KAHAN et al., 1983; LILLEHOJ et al., 1984; ELLIOT et al., 1984; TOWPIC et al., 1985; GELFAND et al., 1987).

Dados experimentais sugerem que, além da inibição da síntese de IL-2, a CSA exerce um efeito imunossupressivo seletivo através de 3 mecanismos distintos:

1. Inibindo a ativação de macrófagos interferindo com isso na síntese de IL-1;

2. Prevenindo a produção de receptores de IL-1 na superfície dos linfócitos T-helper e a síntese de IL-2;

3. Prevenindo a formação de receptores de IL-2 nos linfócitos indiferenciados, portanto, bloqueando a produção de mais linfócitos T-helper, linfócitos T-supressores e linfócitos T-"killer" (DALEY e WYSOCKI.,1984).

Quando ministrada em altas doses, outras células, além das linfóides, podem ser afetadas pela CSA, como por exemplo, células endoteliais, epiteliais e fibroblastos (BOREL et al., 1976). Atuando nas células epiteliais dos folículos pilosos, a CSA pode provocar hipertricose, um efeito colateral observável em quase todos os pacientes sob tratamento imunossupressor com esta droga. Além disto, foi constatado também que a CSA produz uma acentuada melhora nas lesões cutâneas de pacientes portadores de psoríase, enquanto estes recebem a droga como tratamento para artrite (WYSOCKI e DALEY, 1987). Estes e outros achados em pacientes portadores de lesões epiteliais hiperproliferativas, também tratados com CSA, confirmaram seu efeito inibitório sobre a proliferação do epitélio escamoso estratificado, ao contrário do que ocorre nas células epiteliais dos folículos pilosos, que têm seu crescimento

estimulado (WYSOCKI et al., 1983). Foi recentemente demonstrado por nosso grupo (LOPES et al., 1997) que a CSA parece não alterar a evolução das lesões inflamatórias pulpares e periapicais em ratos.

4.2- METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMPs)

As MMPs constituem uma família de enzimas composta por 64 membros, encontrados em plantas, invertebrados e vertebrados que, em conjunto, são capazes de degradar praticamente todos os componentes da matriz extracelular. Destas, 17 são encontradas nos humanos (tabela I). (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; WOESSNER, 1994; PARSONS et al., 1997; GIAMBERNARDI et al.,1998; JOHNSON et al., 1998; MASSOVA et al., 1998; NAGASE et al., 1999).

Tabela I - Família das Metaloproteinases de Matriz em Humanos

MMP	ENZIMA	MASSA MOLECULAR	SUBSTRATO
MMP-1	Colagenase de fibroblasto	57-52 kDa	Colágenos I, II, III, VII, VIII, X, gelatina
MMP-2	Gelatinase de 72 kDa	72 kDa	Gelatina, colágenos IV, V, VII, X, fibronectina, elastina
MMP-3	Estromelisina-1	60-55 kDa	Porção protéica de proteoglicanos, fibronectina, laminina, colágenos IV, V, IX, X e elastina
MMP-7	Matrilisina	———	Idem a MMP-3
MMP-8	Colagenase de neutrófilo	75 kDa	Idem a MMP-1
MMP-9	Gelatinase de 92 kDa	92 kDa	Gelatina, colágenos IV e V, elastina
MMP-10	Estromelisina-2	60-55 kDa	Idem a MMP-3
MMP-11	Estromelisina-3	———	Serpinas (inibidores de serina proteases)
MMP-12	Metaloelastase de macrófago	55 kDa	Idem a MMP-3
MMP-13	Colagenase-3	———	Idem a MMP-1
MMP-14	MT 1-MMP	64-66 kDa	Pró-MMP2, pró-MMP-13, colágeno
MMP-15	MT 2-MMP	———	Desconhecido
MMP-16	MT 3-MMP	———	Pró-MMP-2
MMP-17	MT 4-MMP	———	Desconhecido
MMP-19	Indeterminado	———	Desconhecido
MMP-20	Enamelisina	———	Matriz do esmalte
PUMP 1	PUMP 1	28 kDa	Fibronectina, laminina, colágeno IV, gelatina, porção protéica de proteoglicanos

As MMPs desempenham um papel fundamental em muitos processos normais do organismo, como remodelamento tecidual durante o desenvolvimento, angiogênese, cicatrização e migração celular (WOESSNER, 1991). Além disto, a participação das enzimas desta família no mecanismo de invasão e metástase, na patogênese da artrite reumatóide e da doença periodontal está claramente demonstrada na literatura (BIRKEDAL-HANSEN, 1993). Do ponto de vista terapêutico, muito se tem discutido a respeito de possíveis inibidores de MMPs, os quais poderiam ser utilizados em algumas situações patológicas como doença periodontal e artrite reumatóide. Dentre estes podemos citar as tetraciclinas, doxiciclinas e seus análogos não-antimicrobianos (SORSA et al., 1994) além das minociclinas que são tetraciclinas semi-sintéticas (CIANCIO, 1994).

As principais características destas enzimas são: 1) secreção na forma de um zimogênio, ou seja, em uma forma latente ou inativa; 2) presença de Zn^{++} no sítio catalítico e 3) inibição por inibidores teciduais específicos (TIMPs) (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; PARSONS et al., 1997).

As enzimas desta família apresentam uma estrutura modular, como mostra a figura (II).

- Peptídeo sinal
- Domínio pró peptídeo
- Domínio catalítico
- Domínio fibronectina tipo- II
- Domínio rico em prolina
- Domínio hemopexina
- Porção transmembrana e citoplasmática

N- extremidade amino- terminal

C- extremidade carboxi- terminal

Figura II - Estrutura modular das MMPs

Todas as MMPs apresentam uma organização em domínios, que é mostrada na figura II (MASSOVA, 1998). É possível identificar um domínio de ativação. Outro domínio bem evidente na estrutura das MMPs é o núcleo enzimático, o qual contém o sitio de ligação ao zinco. Segue-se um domínio rico em prolinas e, na extremidade carboxi-terminal, encontra-se um domínio com certo grau de homologia com hemopexina, uma proteína sérica capaz de ligar a grupos heme (GOLDBERG et al.,1986). Os membros da família MMP compartilham um razoável grau de homologia entre si. Apesar disto, existe uma especificidade em nível de substratos. Por exemplo, apesar dos 50% de homologia entre colagenase de fibroblasto e estromelisina, estas apresentam substratos diferentes. Enquanto a estromelisina é capaz de degradar vários substratos incluindo proteoglicanos e gelatina, a colagenase tem sua atividade dirigida primariamente contra moléculas de colágeno tipo I nativo (GROSS e NAGAI, 1965; HARRIS et al.,1984).

A especificidade das colagenases intersticiais (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) pelo colágeno nativo é surpreendente. Elas clivam ambas as cadeias da tripla hélice em um único ponto da molécula, entre um resíduo de glicina e um de leucina ou isoleucina dependendo da cadeia α em questão (HARRIS et al.,1984). Nenhuma outra enzima, exceto algumas colagenases de origem bacteriana, consegue digerir

os colágenos intersticiais organizados em tripla hélice. As cadeias do colágeno tipo I são clivadas em um único ponto de sua seqüência de aminoácidos, entre os resíduos de glicina da posição 775 e isoleucina da posição 776 na cadeia α1 ou glicina 775 e leucina 776 na cadeia α2, sendo os dois fragmentos resultantes susceptíveis à degradação por outras enzimas (HASTY et al., 1993; SOUZA et al., 1994). Os dados existentes na literatura, até o momento, indicam que esta especificidade das colagenases intersticiais é dada pelo domínio carboxi-terminal destas enzimas (SOUZA e BRENTANI, 1992).

Praticamente todas as células da gengiva e do ligamento periodontal são capazes de expressar diferentes MMPs. Por exemplo, os fibroblastos expressam colagenase de fibroblasto, estromelisina-1, gelatinase de 72 kDa, PUMP-1 e estromelisina-3; as células epiteliais sintetizam e secretam colagenase de fibroblasto, gelatinases de 72 e 92 kDa e estromelisina-2; os macrófagos expressam colagenase de fibroblasto, estromelisina-1 e as gelatinases de 72 e 92 kDa, e as células endoteliais colagenase de fibroblasto, estromelisina-1 e gelatinases de 72 e 92 kDa (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

A síntese e degradação das MMPs podem ser reguladas de quatro formas diferentes: 1) por regulação na transcrição gênica; 2) pela ativação de precursores ou formas latentes; 3) por diferenças na especificidade pelos substratos e 4) pela ação de inibidores teciduais

das metaloproteinases de matriz (TIMPs). De uma maneira geral, fatores solúveis como IL-1 α e β, TNF-α, TGF-α, EGF, PDGF, β-FGF, e NGF estimulam transcrição das MMPs, enquanto que TGF-β e IFN-γ podem inibi-la, dependendo do tipo de célula (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

4.3 - *COLÁGENO*

O colágeno é a proteína mais abundante nos mamíferos e constitui o arcabouço de todos os organismos multicelulares, sendo sintetizado, principalmente, pelos fibroblastos do tecido conjuntivo. Ele constitui 25% do total das proteínas do corpo humano e sua produção e degradação em estados fisiológicos e patológicos requerem uma regulação precisa.

A grande família dos colágenos é formada por cerca de dezoito tipos distintos. Destes, os mais comuns são os colágenos intersticiais (tipos I, II e III), que possuem a capacidade de formar fibrilas (OLSEN, 1995).

O tecido conjuntivo da gengiva é denominado de lâmina própria e é rico em colágeno tipo I, que forma um organizado sistema de feixes de fibras, denominados ligamentos gengival e periodontal. As fibras colágenas, em microscopia de luz, têm espessura e orientação variadas e ocupam o compartimento extracelular.

Ultraestruturalmente, a menor unidade reconhecível é a fibrila colágena, com um característico padrão de estrias periódicas que se repetem a cada 64 nm (TEN CATE, 1989).

Do ponto de vista molecular, o colágeno é formado por três cadeias polipeptídicas enroladas na forma de uma tripla hélice. Cada tripla hélice é produzida pela homo- ou hetero-polimerização das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$, dependendo do tipo de colágeno em questão (o colágeno tipo I, por exemplo, é formado por 2 cadeias $\alpha 1$ e 1 cadeia $\alpha 2$). Além dos chamados colágenos intersticiais, outro importante tipo de colágeno é o colágeno tipo IV, um componente estrutural das membranas basais, onde se encontra associado à outras glicoproteínas de matriz extracelular, como laminina e nidogênio.

A estrutura e composição química da tripla hélice confere ao colágeno, além de uma enorme resistência mecânica, uma particular resistência à degradação enzimática. O colágeno tipo I é clivado somente pelas colagenases intersticiais e pela MMP-2 (descritas anteriormente), enzimas que participam da remodelação da matriz extracelular em diversos tecidos, e por algumas colagenases de origem bacteriana. As colagenases intersticiais clivam o colágeno em dois fragmentos desiguais (com ¼ e ¾ do tamanho da molécula) que passam a ser susceptíveis à digestão por outras proteases (SOUZA et al., 1994; AIMES e QUIGLEY, 1995).

4.4 - AUMENTO GENGIVAL ASSOCIADO AO TRATAMENTO COM CICLOSPORINA - A

Os aumentos gengivais não inflamatórios podem ser classificados em: 1-medicamentosos; 2- hereditários, como por exemplo a fibromatose gengival hereditária e síndromes associadas (COLETTA et al., 1998), ou 3- idiopáticos. Esta revisão abordará com detalhes os aumentos gengivais induzidos pela CSA, objetivo deste trabalho.

O aumento gengival induzido por drogas foi relatado inicialmente por KIMBALL (1939) como uma complicação durante o tratamento com 5,5-difenil-hidantoín-sódico, cujo nome oficializado e inscrito em todas as farmacopéias é fenitoína e o comercializado é dilantina.

Além da fenitoína, os bloqueadores do canal de cálcio, especialmente a nifedipina também provocam crescimento gengival (SALO et al., 1990; ANGELOPOULOS, 1975; DONGARI et al., 1993; NISHIKAWA et al., 1991; NISHIKAWA et al., 1996).

A relação entre a CSA e o aumento gengival foi descrita pela primeira vez em 1983 por RATEITSCHAK-PLÜSS et al. A partir de então, numerosos relatos de casos clínicos e estudos laboratoriais correlacionando o uso de CSA com o aumento gengival vêm sendo

publicados na literatura (revisado por SEYMOUR e JACOBS, 1992; NISHIKAWA et al., 1996; NEWELL e IRWIN, 1997).

4.4.1 - Aspectos Clínicos

O aumento gengival afeta entre 25 a 80% dos pacientes que recebem tratamento com CSA (ROSS et al., 1989; McGAW et al., 1988; DELILIERS et al., 1986; FU et al., 1995), com uma ampla variação na suscetibilidade individual e no aspecto clínico. A dosagem sérica de CSA necessária para provocar o aumento gengival parece ficar em torno de 170 a 200 ng/ml (ROSS et al., 1989), embora alguns autores não tenham encontrado correlação entre dosagem de CSA e crescimento gengival (SEYMOUR e SMITH, 1991; WYSOCKI et al., 1983).

O aumento gengival induzido por CSA é mais comum em crianças do que em adultos, sendo evidente cerca de três meses após o início do tratamento (WYSOCKI et al., 1983). DALEY e WYSOCKI (1986) estudando 100 pacientes, incluindo 18 transplantados e 78 com diabetes tipo I submetidos a tratamento com CSA, não encontraram relação direta entre a dose oral ou a concentração de CSA no soro com a gravidade do aumento gengival. Entretanto, a presença de placa dental estava relacionada com o aumento gengival, embora a quantidade da mesma não tenha sido um

fator importante. Após 1 a 18 meses do término da terapia com CSA, houve a regressão do aumento gengival. SOMACARRERA et al. (1994) estudando 100 pacientes que sofreram transplantes de coração, fígado e rim, sugeriram que o fator básico que influencia a gravidade do aumento gengival é a concentração de CSA no sangue, seguida pelos níveis de placa dental e gengivite, sendo um programa de higiene oral antes da cirurgia recomendável. Segundo estes mesmos autores, não foi observado crescimento gengival em áreas edêntulas. Outros autores também detectaram uma correlação entre a presença de placa dental e a incidência de aumento gengival em pacientes tratados com CSA, o que torna a criteriosa higiene bucal de suma importância na sua prevenção (PIHLSTROM, 1990; VOLPE et al.,1997).

A manifestação clínica inicial aparece nas papilas interdentais das superfícies vestibulares das regiões anteriores da maxila e mandíbula, restringindo-se à gengiva inserida (WISOCKI et al., 1983; BUTLER et al.,1987). O tecido hiperplásico apresenta-se firme, róseo, não tendendo ao sangramento, portanto, sem sinais clínicos de inflamação (SPOLIDÓRIO, 1996).

Em ratos, o crescimento gengival é mais visível no lado vestibular que no lingual e menos severo na maxila que na mandíbula, sendo aparentemente dependente da concentração

sangüínea e duração da aplicação da droga. A lesão normalmente regride espontaneamente após a interrupção do uso da droga, e o acúmulo de placa dental bacteriana não parece ser essencial para o início da hiperplasia, embora aparentemente desempenhe um papel importante na sua gravidade. Além do mais, o aumento gengival é mais grave em animais jovens que em ratos adultos (NISHIKAWA et al., 1996; SPOLIDÓRIO, 1996).

Recentemente, MORISACKI et al. (1997) mostraram, em um trabalho experimental realizado em ratos, a existência de uma correlação positiva entre os níveis séricos de CSA e a gravidade do crescimento gengival, medida através da profundidade do sulco gengival. Segundo FU et al.(1995), o crescimento gengival nos sentidos buco-lingual, mésio-distal e vertical foram significativamente maiores com o aumento da dosagem de CSA.

4.4.2- Mecanismo de Ação da CSA:

O mecanismo de ação da CSA nos fibroblastos gengivais não é ainda conhecido. BARTOLD (1989) demonstrou que ocorre um aumento na síntese de DNA e na taxa de proliferação celular de fibroblastos normais humanos em cultura primária tratados com CSA, sendo este efeito ainda mais evidente quando os fibroblastos foram isolados da gengiva de pacientes portadores de aumento gengival

induzido pela droga.

Segundo SPOLIDÓRIO (1996), 100% dos ratos tratados com 10mg/kg de peso corporal de CSA diariamente apresentaram crescimento gengival, que foi caracterizado principalmente pelo aumento na quantidade de fibroblastos e de fibras colágenas na matriz extracelular. Entretanto, segundo o mesmo autor, a proporção normal entre estes componentes foi mantida. Um espessamento do epitélio gengival também é característica do aumento gengival induzido pela CSA (SPOLIDÓRIO, 1996; MORISACKI et al., 1997). Amostras de tecido proveniente deste tipo de aumento gengival exibem, quando observadas em microscopia de luz, grande quantidade de colágeno organizado em densos feixes de fibras. De fato, vários autores sugerem que o aumento gengival induzido por CSA seja uma consequência de um aumento na quantidade de fibras colágenas no conjuntivo gengival (RATEITSCHAK-PLÜSS et al.,1983; WYSOCKI et al.,1983; DELILIERS et al.,1986; BONNAURE-MALLET et al.,1995). KITAMURA et al. (1990) observaram que a hiperplasia gengival decorrente da utilização de CSA, consiste de tecido conjuntivo fibroso sem aumento significativo do número de fibroblastos ou células inflamatórias. PISANTY et al. (1990), sugeriram que o aumento gengival em decorrência da utilização de CSA não é resultado do aumento na produção de colágeno, mas

devido principalmente à proliferação epitelial.

SCHINCAGLIA et al., (1992) foram capazes de demonstrar níveis aumentados de RNAs mensageiros para colágeno tipo I, assim como um aumento de até três vezes na secreção de pró-colágeno tipo I para o meio de cultura, em fibroblastos humanos provenientes de GCN e tratados com CSA *"in vitro"*. GHIGGERI et al.(1994) também observaram um aumento na síntese de colágeno tipo III por fibroblastos renais em cultura primária estimulados com 5 ng/ml de CSA no meio de cultura.

A CSA parece estimular a síntese tanto de colágeno como de outros componentes não colagênicos da matriz extracelular. Alguns autores, realizando estudos "in vitro"', observaram que a CSA e seus metabólitos aumentam a síntese de colágeno e que, provavelmente, essa droga age sobre os fibroblastos gengivais, através de um efeito direto pelo contato durante a administração oral ou por via intravenosa (SHINCAGLIA et al., 1992; MARIANI et al., 1996). Da mesma maneira, outros autores mostraram que a hidroxiciclosporina (M17), um dos produtos do metabolismo da CSA, também aumenta a síntese de colágeno (PHILLIPS et al., 1997). MARIANI et al. (1996) detectaram um aumento na síntese e deposição de glicosaminoglicanos sulfatados e não sulfatados no tecido gengival de pacientes sob tratamento com CSA e também em cultura primária

de fibroblastos gengivais humanos normais tratados com a droga. Já segundo WILLERSHAUSEN-ZÖNNCHEN et al. (1992), a CSA aumenta a síntese de colágeno tipo I e também de gliocosaminoglicanos por fibroblastos gengivais devido a um aumento na taxa de proliferação celular. Em contraste, WONDIMU e MODÉER (1997) não detectaram aumento na quantidade de fibras de colágeno, mas sim de matriz extracelular não colagênica, além de relatarem um aumento da espessura do epitélio gengival. Uma síntese aumentada de glicosaminoglicanos também foi observada por NEWELL e IRWIN (1997), estudando fibroblastos normais e derivados de aumentos gengivais induzidos por CSA. WILLIAMSON et al. (1994) detectaram um aumento na quantidade de IL-6 e de seu RNA mensageiro no tecido gengival de pacientes tratados com CSA. A IL-6 é uma proteína de aproximadamente 26 kDa, anteriormente denominada de fator 2 estimulante de células B (BSF-2), devido à sua capacidade de promover a diferenciação de células B e induzir a maturação final dos plasmócitos, embora também atue em outros tipos celulares (SATOH et al., 1988). Os resultados de WILLIANSON et al. (1994) sugerem que a IL-6 atue como um fator estimulante para a atividade de fibroblastos.

Foi demonstrado ainda que a CSA é capaz de potencializar a síntese de prostaglandina E2 (PGE-2) induzida pelo fator de necrose

tumoral alfa (TNF-α) em fibroblastos gengivais humanos (WONDIMU e MODÉER,1997). Este achado é interessante, pois há relatos na literatura mostrando que a PGE-2 pode alterar a síntese de ácido hialurônico, de proteínas não colagênicas e também de colágeno tipo I por fibroblastos gengivais (BARTOLD et al.,1988; ARAI et al.,1995; MODÉER et al.,1996). Em contrapartida, estudo da ação da CSA no tecido gengival *"in vivo"* e *"in vitro"* demonstrou uma redução dose dependente na síntese de PGE-2 (NELL et al.,1996).

Uma outra maneira através da qual a CSA poderia influenciar a síntese de colágeno seria através de sua interação com ligantes citoplasmáticos específicos, as ciclofilinas. Como mencionado anteriormente, as ciclofilinas fazem parte de um grupo de enzimas que aceleram o "folding" da tripla hélice do colágeno. Entretanto, os dados experimentais existentes na literatura não confirmam esta hipótese, mostrando que a ligação da CSA inibe a ação das ciclofilinas (FISCHER et al.,1989).

O infiltrado inflamatório presente na gengiva de pacientes tratados com CSA foi estudado através de reações imunohistoquímicas por O'VALLE et al. (1994). Segundo estes autores, a relação CD4/CD8 é significativamente maior em pacientes transplantados do que nos pacientes normais. Utilizando anticorpos monoclonais anti-CSA, os mesmos autores foram capazes de

demonstrar depósitos da droga no interior de células epiteliais da gengiva, sugerindo a participação destes na etiopatogenia do aumento gengival. Outros autores (NIIMI et al., 1990), também usando imunohistoquímica, mostraram que o tratamento com CSA não altera a expressão de antígenos do complexo MHC classe II (HLA-DR, DQ e DP) pelas células do epitélio gengival. Mostraram ainda que a concentração de CSA na placa dental é mais alta do que no sangue e no tecido gengival, sendo esta uma possível explicação para o efeito localizado da CSA sobre o tecido gengival.

HEMPELMANN et al. (1991) observaram que a CSA inibe a liberação de MMPs por neutrófilos polimorfonucleares. Com relação à ação da CSA sobre os fibroblastos gengivais, um estudo feito em cultura primária mostrou que células estimuladas com IL-1 passaram a expressar uma maior quantidade de colagenase sob a ação da CSA (LOHI et al.,1994). Foi demonstrado recentemente por SUGANO et al. (1998) que a CSA inibe a expressão gênica da MMP-1 por fibroblastos gengivais humanos. Maiores estudos são necessários para a compreensão do papel das MMPs na patogênese do aumento gengival induzido por CSA.

4.5 - GENGIVA DE RATO

O uso de animais nos estudos da doença periodontal oferece a vantagem de permitir a avaliação tanto prospectiva como retrospectiva, eliminando o fator ético relacionado com o desenvolvimento de alterações em humanos (GRIFFITHS et al., 1988; KLAUSEN, 1991). Os ratos apresentam muita semelhança com o homem no que se refere à anatomia do periodonto, no desenvolvimento e composição da placa bacteriana, histologia e imunologia básica das lesões periodontais (LISTGARTEN, 1975; PAGE e SCHOROEDER, 1982).

4.5.1 - Gengiva de Molares de Rato

A morfologia da gengiva dos molares de rato, assim como da gengiva humana, está bem descrita na literatura. Durante as últimas décadas, com o auxílio do microscópio eletrônico de transmissão, a gengiva de molares de rato, bem como de outros animais, têm sido utilizadas como modelos para o estudo das alterações celulares e ultraestruturais provocadas pela doença periodontal. A junção dento-gengival nos molares de rato é muito semelhante à encontrada em humanos, a não ser pela presença de queratina no sulco gengival (LISTGARTEN, 1975). A lâmina própria da gengiva dos molares de

rato é formada por fibras colágenas delgadas, situadas entre o epitélio e as fibras do ligamento transeptal, com grandes espaços intersticiais.

4.5.2 - Gengiva de Incisivos de Rato

A gengiva dos incisivos de rato é a delgada faixa de tecido situada acima da crista óssea alveolar, formando entre os dois incisivos uma longa papila interdental. Devido às características particulares dos incisivos, na face labial a gengiva está aderida ao esmalte dentário e, nas faces laterais e lingual, ao cemento. MARTINEZ (1971), comparando ultraestruturalmente o epitélio gengival da gengiva dos incisivos e dos molares, sugeriu que na região dos incisivos ele é mais resistente, provavelmente devido ao tipo de mastigação dos roedores.

Segundo SCHELLENS et al. (1979), o tecido conjuntivo gengival das faces recobertas por cemento de incisivos de camundongo é dividido em duas zonas separadas por uma estrutura epitelial denominada de papila circundental, a primeira, em contato com o dente e em continuidade com o ligamento periodontal, e a segunda, formada pela lâmina própria da gengiva. Estes mesmos autores observaram também que os fibroblastos do tecido conjuntivo gengival relacionado com o dente são muito semelhantes aos do ligamento

periodontal. Devido ao constante movimento eruptivo dos incisivos de rato, o ligamento periodontal (matriz extracelular e células) é completamente reabsorvido na porção imediatamente abaixo do epitélio juncional (SCHELLENS et al., 1982; GRANER et al., 1995).

PROPOSIÇÃO

5-PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi:

a) avaliar o efeito da CSA sobre a produção e atividade das MMPs na gengiva de ratos e em culturas primárias de fibroblastos gengivais de ratos e humanos.

b) analisar o efeito da CSA sobre a quantidade de colágeno tipo I presente na gengiva de ratos, assim como em culturas primárias de fibroblastos gengivais.

MATERIAIS E MÉTODOS

6-MATERIAL E MÉTODOS

6.1- ANIMAIS

Para a presente pesquisa foram utilizados 36 ratos (*Ratus norvegicus albinus*, Wistar), machos, jovens, pesando cerca de 50 g, tratados com água e ração "*ad libitum*". Os animais foram mantidos em caixas plásticas, divididos em 12 grupos de 3 animais e injetados diariamente, via subcutânea, com 10 mg/Kg de peso corporal de CSA (Sandimmum, NOVARTIS) durante 30 e 60 dias. Esta dosagem aplicada por via subcutânea é bem tolerada pelos ratos, mantendo uma concentração sérica constante em torno de 1ug/ml (WASSEF et al.,1985). Os animais do grupo controle foram injetados de forma similar com solução de soro salina (NaCl) a 0,9%. A CSA, adquirida em ampolas para infusão intravenosa na concentração de 50mg/ml, foi diluída com solução de NaCl a 0,9% até a concentração de 10mg/ml. Os animais foram pesados semanalmente para o ajuste da dose da CSA. Após 30 e 60 dias do início do tratamento com droga, os animais foram sacrificados pela inalação excessiva de éter etílico e a gengiva da região dos molares superiores e inferiores, assim como da face distal dos incisivos inferiores, foi cuidadosamente

removida com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15. O tecido retirado foi usado para as análises bioquímicas da expressão de colágeno tipo I e de MMPs, como descrito a seguir.

Após o término da aplicação da CSA, quatro grupos de 30 e 60 dias foram selecionados para o estudo da regressão do aumento gengival. Após esse período sem as injeções, os animais de cada grupo foram acompanhados até o dia do sacrifício durante 30 dias, recebendo neste período alimentação normal e água *"ad libitum"*. Os do grupo controle foram sacrificados no mesmo período.

6.2- ANÁLISE DA ATIVIDADE DAS MMPs NA GENGIVA DE RATOS TRATADOS COM CSA.

6.2.1- Obtenção das MMPs: Para análise da atividade das MMPs na gengiva de molares e incisivos de ratos normais e tratados com CSA, nos períodos de 30 e 60 dias, o tecido gengival removido foi cortado em pequenos fragmentos com cerca de 1mm de maior diâmetro, lavados várias vezes com soro fisiológico e incubados em 300 µl de meio de cultura celular acrescido de 50 µg/ml de garamicina (meio Eagle modificado por Dulbecco - DMEM - Sigma), sem adição de soro fetal bovino, por cerca de 18 h a 37°C. O meio de

cultura condicionado foi então utilizado para as análises de atividade enzimática (zimogramas).

6.2-2 Zimogramas com meio de cultura condicionado pela gengiva de ratos: Os meios de cultura condicionados tiveram a concentração total de proteína avaliada pelo método de Bradford e, a seguir, quantidades iguais de proteína total foram misturadas com um tampão de amostra não-redutor (2% de SDS, 125 mM de Tris-HCl pH 6,8, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol) e aplicadas em SDS - PAGE a 10 % co-polimerizados com gelatina ou caseína (Sigma - USA) nas concentrações de 1,6 e 0,5 mg/ml de gel, respectivamente. A eletroforese foi feita a 4°C para evitar sobreaquecimento das amostras. Após a eletroforese, os géis foram incubados por 1 h a 37°C, sob suave agitação, em uma solução aquosa de Triton-X100 a 2%, com o objetivo de renaturar as proteínas desnaturadas pelo SDS, sendo a seguir incubados por mais 16 h em tampão contendo 50 mM de Tris-HCl pH 7,4 e 5 mM de $CaCl_2$ (tampão ótimo para a ação das MMPs) a 37°C. A verificação da atividade enzimática foi feita após coloração dos géis com o corante Coomassie blue R-250, como bandas negativas de massa molecular correspondente às enzimas com atividade gelatinolítica e caseinolítica (COLETTA, 1996; FEITOSA et al.,1998).

6.2-3 Inativação das MMPs: As amostras de meio de cultura condicionado foram submetidas à eletroforese como descrito acima, os géis tratados com solução aquosa de Triton-X100 a 2%, e incubados por 16 h em tampão contendo 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM de $CaCl_2$ e 1 mM de fenantrolina (Sigma, USA). A seguir, os géis foram corados com Coomassie blue a 0,05% e descorados em solução contendo 50% de metanol e 10% de ácido acético (a fenantrolina é um inibidor específico das MMPs).

6.3-CÉLULAS

6.3-1 Cultura primária de fibroblastos gengivais de ratos: Tecido gengival da região de molares e de incisivos inferiores de ratos foi removido imediatamente após o sacrifício dos animais e imerso em meio de cultura celular (DMEM) contendo 125 ug/ml de garamicina e 50 ng/ml de anfotericina B. A seguir, os fragmentos foram lavados três vezes em meio de cultura e transferidos para frascos de cultura de 25 cm^2 (Costar), contendo 4 ml de meio acrescido de garamicina, anfotericina B e 10% de soro fetal bovino, que foi trocado a cada 2 dias. Após 15, dias a concentração de garamicina do meio de cultura foi reduzida para 50 ug/ml. Quando as células estavam semi-confluentes, o frasco de cultura foi tripsinizado

(solução de tripsina a 0,2% em PBS) e as células divididas em outros dois frascos, processo que foi repetido até que os fibroblastos fossem separados das células epiteliais, que não resistem a tripsinizações sucessivas, permitindo o isolamento e congelamento de linhagens puras de fibroblastos gengivais.

6.3-2 Cultura primária de fibroblastos gengivais humanos:

As linhagens de fibroblastos gengivais provenientes de GCN utilizadas no presente trabalho foram previamente estabelecidas em nosso laboratório (COLETTA et al., 1998). Estas amostras de gengivas foram obtidas de pacientes jovens (média de 24 anos), da região de gengiva inserida entre a distal do canino e primeiro pré-molar superiores.

6.3-3 Tratamento dos fibroblastos gengivais em cultura com CSA:

2 x 10^4 células foram plaqueadas em cada poço de placas de cultura de 96 poços (Costar) em DMEM contendo 50 ng/ml de anfotericina B e 10% de soro fetal bovino. Após 24 h o meio foi trocado por DMEM contendo diferentes concentrações de CSA (25, 50, 100, 250, 500 e 1000 ng/ml de meio de cultura) (WILLERSHAUSEN-ZONNCHEN et al., 1992), que era trocado a cada 2 dias, durante um período de 6 dias. A seguir, as células foram

lavadas 3 vezes com PBS e o meio foi substituído por DMEM sem soro fetal bovino (porém, mantendo-se as mesmas concentrações de CSA), que foi condicionado por um período de 24 h, recolhido e utilizado para os zimogramas e western blots. O número de células presente nos poços no momento do experimento foi monitorado plaqueando-se poços adicionais para cada tratamento realizado, nos quais as células foram soltas com solução de tripsina e contadas em câmara de Neubauer. No momento da finalização dos experimentos havia cerca de 2,5 x 10^4 fibroblastos por poço.

6.3-4 Imunoprecipitação: Foram plaqueadas 2 fileiras de poços de placas de cultura de 96 poços com fibroblastos gengivais humanos normais e aguardada a confluência. Logo após, as células foram tratadas com CSA de acordo com o protocolo já descrito anteriormente. Os meios condicionados de 4 poços iguais foram recolhidos, misturados (num volume total de aproximadamente 400ul), acrescidos de 0,5mM de PMSF e incubados com proteína A-Sepharose (suspensão em 20% de etanol, 6mg/ml) (Sigma) (aproximadamente 30ul) previamente equilibrada em TBST pH7,4. A incubação foi realizada por 2 h a 4°C em orbital. O sobrenadante foi então incubado, também a 4°C, com anticorpos anti-MMP-1 (The Binding Site - Londres) diluídos 1:200, tomando-se o cuidado de fazer

um controle negativo com soro normal de cabra para cada amostra. Estas incubações foram transferidas para tubos contendo 20ul de proteína A-Sepharose previamente equilibrada com TBST pH7,4 e incubadas por mais 2 h a 4°C. A seguir, foram suavemente centrifugadas e os sobrenadantes recuperados, sendo as resinas lavadas 8 vezes com TBST pH7,4 a 4°C.

6.3-5 Zimogramas com meio de cultura obtido de fibroblastos gengivais: Os meios de cultura condicionados pelos fibroblastos gengivais tratados ou não com CSA, como descrito, tiveram a quantidade de proteína total determinada pelo método de Bradford, sendo que quantidades equivalentes aplicadas em cada canaleta de SDS - PAGE co-polimerizados com gelatina (como descrito anteriormente). Os produtos das reações de imunoprecipitação foram analisados da mesma maneira, utilizando-se para isso a proteína A-Sepharose, depois de devidamente lavada. Como controle foram utilizados os sobrenadantes (material não imunoprecipitado) de cada reação.

6.4 WESTERN BLOTS

6.4-1 Detecção de MMPs secretadas para o meio de cultura: As proteínas, contidas no meio de cultura condicionado das placas de 96 poços contendo as células tratadas nas concentrações de CSA descritas, foram separadas eletroforeticamente em SDS - PAGE a 10% em condições redutoras (Tris - HCl 62mM, SDS 2%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,2% 200mM de β-mercaptoetanol - LAEMMLI, 1970) e transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45um) (Pharmacia). A eficiência das transferências foi verificada através da coloração das membranas com o corante Ponceau (Sigma). A seguir, as membranas foram bloqueadas com PBS contendo 3% de BSA (Sigma) por 2 h à temperatura ambiente e depois incubadas, também por 2 h à temperatura ambiente, com os anticorpos primários policlonais anti-colagenase de fibroblastos (MMP-1), anti-gelatinase de 72kDa (MMP-2), anti-estromelisina-1 (MMP-3) e anti-gelatinase de 92 kDa (MMP-9) (The Binding Site - Londres) diluídos na concentração de 1:1000 em PBST contendo 0,05% de Tween 20 (PBST). Após lavagens extensivas (3 vezes de 10 mim com PBST), as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de carneiro conjugados com biotina (Sigma),

diluídos 1:2000 em PBST, por 1 hora, à temperatura ambiente. Depois de nova série de lavagens com PBST, foi realizada a incubação com estreptavidina conjugada com a enzima peroxidase (Sigma), diluída 1:2000 no mesmo tampão, durante 30 mim, também à temperatura ambiente. Após nova seqüência de lavagens, as reações foram submetidas a revelação com 3,3'- diaminobenzidina (DAB) (Sigma - Fast^{TM}). Como controle negativo foi usado soro normal de carneiro nas mesmas diluições usadas para os anticorpos primários. A intensidade das bandas obtidas nos western blots foi analisada através de densitometria (densitômetro BIORAD GS-700). Para podermos comparar os experimentos realizados nas diferentes linhagens celulares usadas neste estudo, realizamos a seguinte normalização: a D.O. de todas as bandas correspondentes as MMPs das células tratadas com 25, 50, 100, 250, 500 ou 1000 ng/ml de CSA foram divididas pela D.O. dos respectivos controles, sem CSA. Esta D.O. relativa obtida foi usada para as comparações, sendo os resultados obtidos analisados pelo teste de Mann - Whitney.

6.4-2 Extratos protéicos totais de fibroblastos: Após o meio de cultura celular ter sido condicionado pelos fibroblastos na presença de diferentes concentrações de CSA e coletado para os ensaios de análise da atividade e produção das MMPs, foram

realizadas extrações de proteínas dos fibroblastos remanescentes. Para isto, foram usados 150ul do tampão de lise constituído de 50mM de Tris-HCl pH 7,4; 1% de Triton X-100; 1mM de aprotinina, benzamidina, leupeptina e PMSF, por poço das placas de 96 poços durante 10 mim sob suave agitação, a 4°C. As células foram soltas com este tampão e o procedimento monitorado em um microscópio de contraste de fase, para verificar o momento em que todas as células haviam sido soltas. A seguir, as amostras de cada duplicata foram misturadas, centrifugadas durante 5 mim em microcentrífuga a 12.000rpm, sendo o precipitado desprezado. Todo esse processo foi realizado a 4°C para evitar a degradação do material, e a concentração protéica de cada extrato de fibroblastos foi determinada através do método de Bradford. Todos extratos obtidos foram então armazenados a –70°C.

6.4-3 Detecção de colágeno tipo I: Para análise da quantidade de colágeno tipo I, os extratos protéicos dos fibroblastos gengivais remanescentes nas placas de 96 poços, após a coleta dos meios condicionados, foram aplicados em quantidades iguais em canaletas de SDS - PAGE 10%, transferidos para membranas de nitrocelulose como descrito e usados para os ensaios de western blot. Depois de bloqueados com solução de BSA a 3% em PBST, as

membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos contra as cadeias α1 do colágeno tipo I (Biodesing International, Kennebunk, ME), diluídos 1:2000 em PBST. Após 3 lavagens com PBST (3 vezes de 10 mim), as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina, diluídos 1:5000 por 1 hora. Após nova seqüência de lavagens foi realizada a revelação usando NBT/BCIP (GIBCO- BRL).

6.5 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE COLÁGENO TIPO I

6.5-1 Extração de colágeno tipo I de caudas de ratos (Guis et al., 1973): Caudas de quatro ratos Wistar, sacrificados pela inalação excessiva de éter etílico, foram seccionadas na raiz, a pele foi removida e os tendões retirados e homogeneizados em tampão contendo NaCl a 0,45 M e centrifugados por 5 mim a 2000g. O precipitado foi ressuspendido no mesmo tampão e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 100 ml de solução de NaCl a 0,2 M e centrifugado por 5 mim a 2000g. A extração do colágeno foi realizada com solução de ácido acético 0,5 M por 15 h a 4°C. A seguir, o colágeno foi liofilizado e armazenado.

6.5-2 Extração de colágeno tipo I da gengiva de molares e incisivos de ratos tratados ou não com CSA: O colágeno tipo I foi extraído da gengiva de molares e incisivos de ratos tratados ou não com CSA com solução de ácido acético 0,5M. Os mesmos fragmentos de gengiva previamente incubados com o meio de cultura celular foram incubados com 400 ul de uma solução de ácido acético 0,5 M durante 12 h, sob suave agitação. Após este período, o material foi centrifugado em microcentrífuga e o sobrenadante recuperado e armazenado a 4°C. A operação foi repetida mais uma vez e o novo sobrenadante coletado misturado ao primeiro e então, extensivamente, dializado contra água destilada e deionizada a 4°C. O material foi liofilizado, ressuspendido em tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970), fervido por 5 mim e submetido à eletroforese em SDS - PAGE a 10%, corados com Coomassie blue a 0,05%.

7- RESULTADOS:

Após 30 ou 60 dias sendo injetados com CSA, todos os animais apresentaram um aumento gengival clinicamente evidente, tanto na gengiva de molares como na de incisivos, ligeiramente maior com 60 dias de tratamento (figuras 1 A, B, C e D) e mais acentuado na gengiva adjacente aos dentes inferiores. Na região de molares, o aumento gengival foi mais evidente na gengiva vestibular (figura C e D), enquanto que na região de incisivos, o aumento gengival foi maior na porção labial da papila interdental, causando afastamento entre os dentes (figura A e B). Além do crescimento gengival, os ratos que receberam o tratamento imunossupressor tiveram um crescimento mais acentuado das unhas e o peso corporal ligeiramente inferior que os animais do grupo controle, além de apresentarem perda de pêlos no local da injeção.

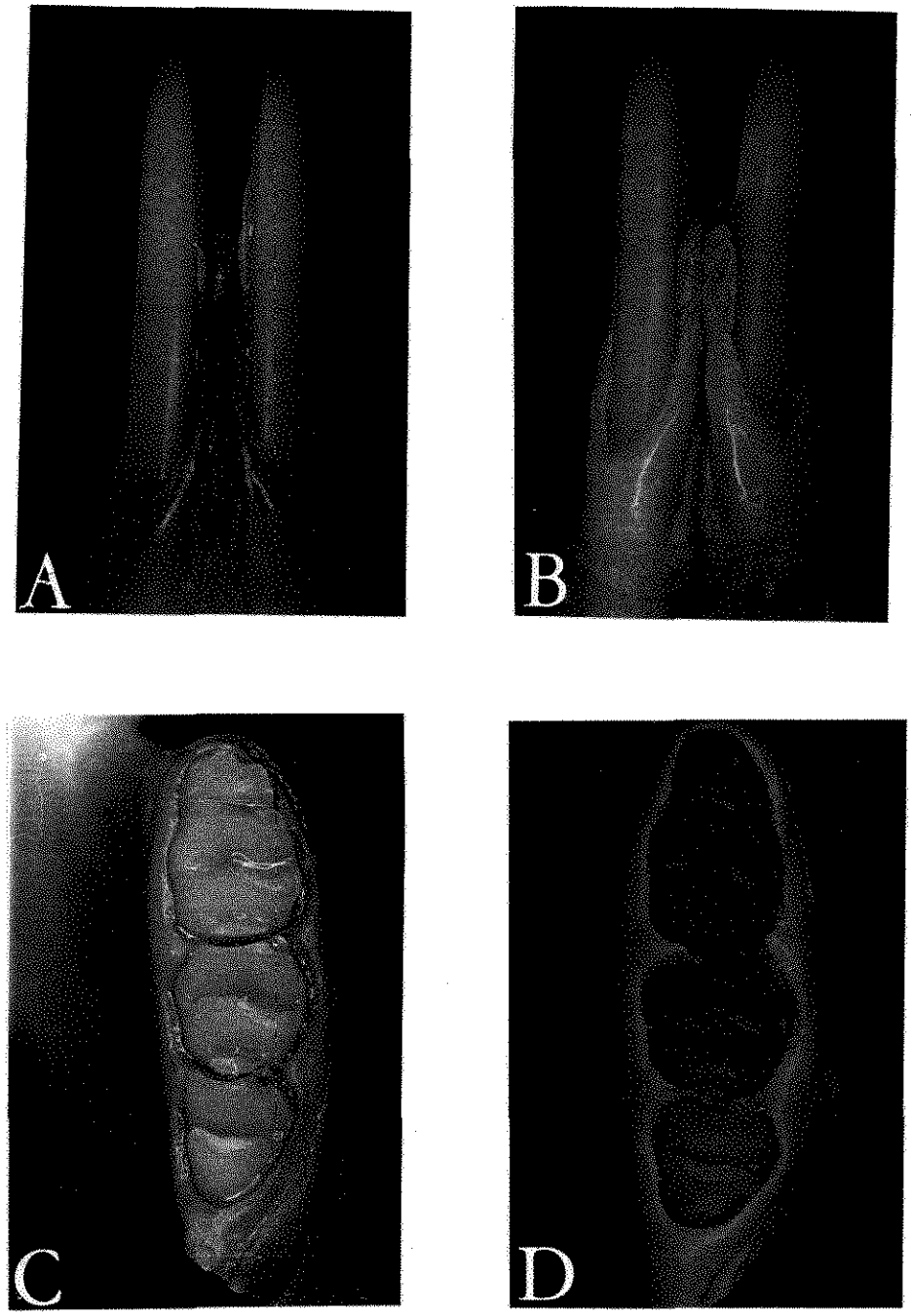

Figura 1: Características clínicas da gengiva da região de incisivos e molares inferiores de ratos após o tratamento com CSA durante 60 dias. A) gengiva da região de incisivo de um animal controle injetado com solução salina, B) gengiva da região de incisivo após tratamento com CSA, mostrando um evidente crescimento da papila interdental causando a separação dos incisivos, C) gengiva da região de molares de um animal controle, D) gengiva da região de molares de um animal tratado com CSA, mostrando o crescimento gengival, mais evidente na face labial.

7.1- Atividade Gelatinolítica do Tecido Gengival de Ratos:

Após os períodos de tratamento, os animais foram sacrificados pela inalação excessiva de éter etílico e o tecido gengival imediata e cuidadosamente removido. Este material foi então lavado em solução de soro fisiológico a 4°C, pesado e mantido em frascos contendo meio de cultura celular acrescido de 50 ug/ml de garamicina sem soro fetal bovino. Para as primeiras análises do efeito da CSA na atividade das MMPs, o tecido gengival foi cortado em pequenos fragmentos com cerca de 1mm de maior diâmetro e usado para condicionar volumes definidos de meio de cultura celular (como descrito em Materiais e Métodos). O meio condicionado obtido foi então separado eletroforeticamente em SDS - PAGE a 10% contendo gelatina como substrato (ensaios zimográficos), que foram incubados por 16 h em tampão ideal para ação das MMPs. Nestes experimentos foram observadas três bandas negativas indicativas da degradação da gelatina contida no gel, com massa molecular estimada em 45 - 50 kDa, correspondendo provavelmente à colagenase de fibroblasto (MMP-1) (figura 2, canaletas 1 e 2). Outras bandas mais fracas e com maior massa molecular também foram detectadas, indicando provavelmente a ação da gelatinase de 72 kDa (MMP-2) (figura 2, canaletas 1 e 2).

A atividade gelatinolítica do meio de cultura celular, condicionado pelo tecido gengival de molares ou incisivos de rato, foi nitidamente reduzida nos animais tratados com CSA, tanto para as enzimas com 45 - 50 kDa como para as formas de maior massa molecular, na gengiva de molares (figura 2, canaleta 3) e de incisivos (figura 2, canaleta 4). Como podemos observar na figura 2, o meio de cultura, condicionado com gengiva dos animais tratados com a droga, praticamente não apresentou atividade gelatinolítica na altura de 66 kDa (canaletas 3 e 4). No intuito de caracterizar essas proteinases como pertencentes à família das MMPs, acrescentou-se ao tampão de incubação dos zimogramas o inibidor de proteinases 1,10 - fenantrolina, que provocou uma completa inibição da atividade enzimática (figura 2, canaleta 5).

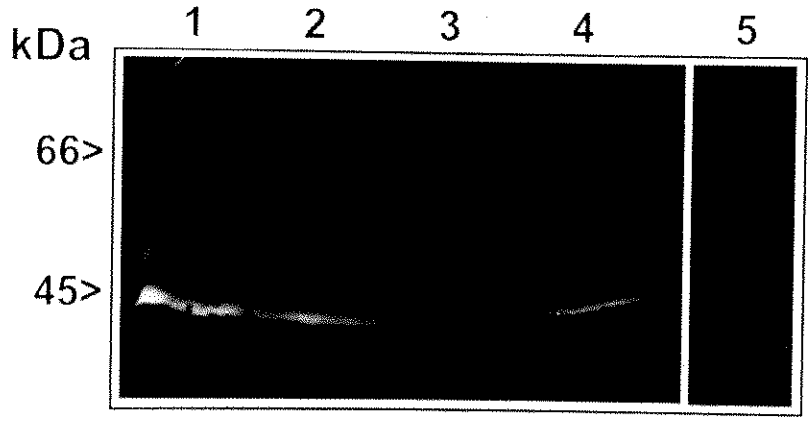

Figura 2: Zimograma mostrando a atividade gelatinolítica dos meios de cultura celular condicionados com os fragmentos de gengiva de ratos normais e tratados com CSA. Podemos observar bandas na altura de 45 - 50 kDa, correspondendo provavelmente à colagenase de fibroblastos (MMP-1), e de aproximadamente 66 kDa, que foram interpretadas como sendo produzidas pela atividade da MMP-2. As canaletas 1 e 2 correspondem, respectivamente, aos meios condicionados por tecido gengival da região de molares e incisivos. Após o tratamento com CSA, a atividade gelatinolítica de todas as bandas foi nitidamente reduzida, tanto no meio condicionado por gengiva de molares (3) como por gengiva de incisivos (4). A canaleta 5, realizada com amostra de meio condicionado por tecido gengival da região de molares sem tratamento com CSA, mostra uma completa inibição da atividade gelatinolítica pela incubação com 0,5mM de 1,10-fenantrolina.

7.2- Análise do Colágeno Tipo I Extraído da Gengiva de Ratos:

Depois de usado para condicionar o meio de cultura, os mesmos fragmentos de tecido gengival foram utilizados para a extração de colágeno tipo I, pelo tratamento com ácido acético. A análise em SDS - PAGE a 10% do colágeno extraído mostrou que existe uma nítida diferença na quantidade desta glicoproteína, quando comparamos os animais normais com os tratados com CSA. A figura 3 mostra que a quantidade de colágeno tipo I foi maior na gengiva dos animais tratados com CSA (canaletas 3 e 5) do que nos animais controle (canaleta 2 e 4). A canaletas 2 e 3 correspondem ao colágeno tipo I extraído da gengiva de molares e as canaletas 4 e 5 da gengiva de incisivos de rato. Nos animais utilizados para o estudo da regressão do aumento gengival após o término do tratamento, a quantidade de colágeno diminui após 30 dias sem a droga (figura 4), principalmente na gengiva dos incisivos (figura 4, canaleta 5). Esta figura nos mostra uma nítida diferença na quantidade desta glicoproteína quando comparamos com o grupo controle. As canaletas 1 e 2 contêm o colágeno extraído da cauda de ratos utilizado como padrão. Na figura 4, as canaletas 3 e 6, respectivamente, apresentam o colágeno de incisivos e molares normais, as canaletas 4 e 7 o colágeno extraído

da gengiva de incisivos e molares de ratos tratados com CSA e as canaletas 5 e 8 mostram a quantidade de colágeno extraído da gengiva de incisivos e molares, após um período de 30 dias sem uso da droga.

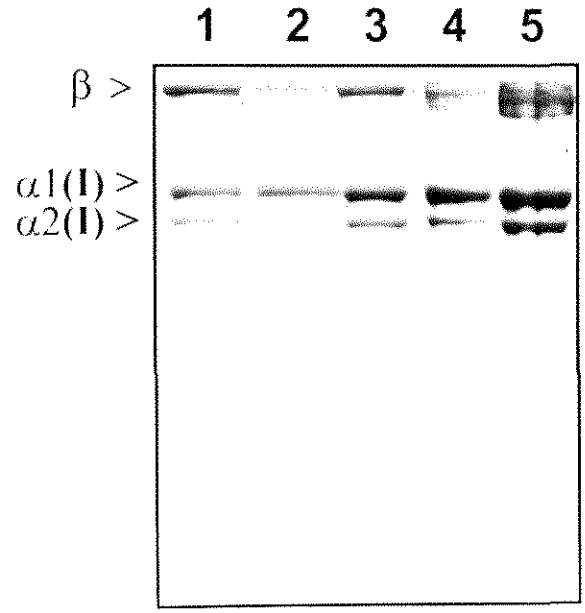

Figura 3: Análise da quantidade de colágeno tipo I na gengiva dos animais normais e tratados com CSA, através de SDS - PAGE corado com Coomassie blue. Na canaleta 1 temos 10ug de colágeno tipo I purificado a partir de caudas de rato, utilizados como padrão. Podemos observar nas canaletas 2 e 4, respectivamente, o colágeno extraído da gengiva de molares e incisivos normais e nas canaletas 3 e 5 após o tratamento com CSA (3- molares, 5- incisivos). Podemos observar que a quantidade de colágeno tipo I é maior nos animais tratados do que nos animais controle.

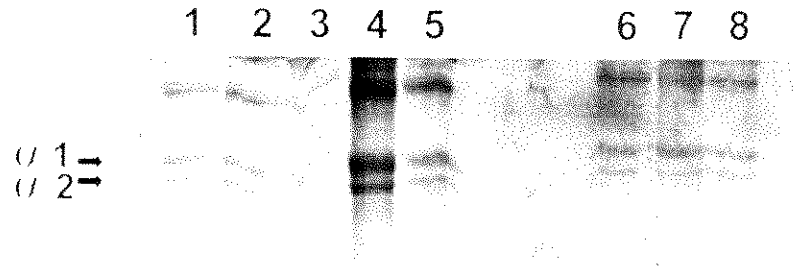

Figura 4: Experimento semelhante ao mostrado na figura anterior, realizado com tecido gengival de molares e incisivos de ratos tratados ou não com CSA, contendo também o colágeno tipo I extraído após um período de 30 dias sem o uso da droga. As canaletas 1 e 2 contêm os padrões de colágeno tipo I (10 e 15ug, respectivamente), as canaletas 3 e 6, respectivamente, contêm o colágeno de incisivos e molares normais, as canaletas 4 e 7 o colágeno extraído da gengiva de incisivos e molares de ratos tratados com CSA e as canaletas 5 e 8 mostram a quantidade de colágeno extraído da gengiva de incisivos e molares de ratos, após o período de 30 dias sem o uso da droga.

7.3- Atividade Gelatinolítica dos Meios de Cultura de Fibroblastos Tratados com CSA:

Tendo-se em vista que a análise zimográfica dos meios de cultura celular condicionados com fragmentos de tecido gengival apresentou, em todos os experimentos, múltiplas bandas gelatinolíticas, possivelmente oriundas tanto do tecido conjuntivo como epitelial, decidimos partir para o estudo de culturas primárias de fibroblastos gengivais. Desta forma, culturas primárias de fibroblastos da gengiva das regiões de incisivos e molares de ratos normais foram estabelecidas e utilizadas em experimentos semelhantes. Utilizamos também neste estudo culturas primárias de fibroblastos provenientes de biópsias de gengiva inserida das GCN, previamente estabelecidas e estocadas em nosso laboratório (figuras 5 A e B).

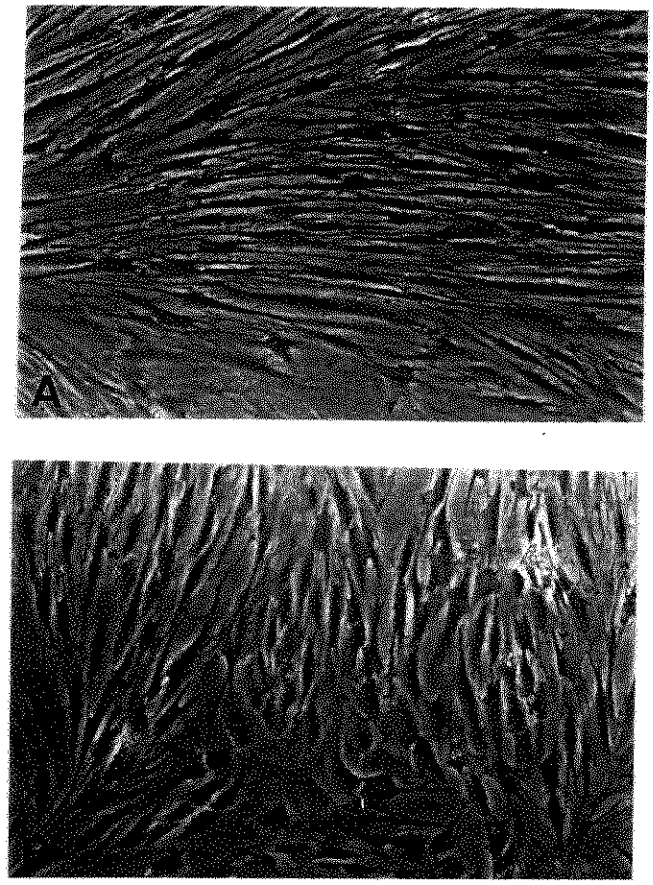

Figura 5: Fibroblastos gengivais em culturas primárias, observados em microscopia de contraste de fase (aumento original de 250 X). Morfologicamente, os fibroblastos provenientes da gengiva de rato são menos alongados e apresentam um volume citoplasmático aparentemente maior do que os crescidos a partir da gengiva humana clinicamente normal.

A - Cultura de fibroblastos gengivais humanos

B - Cultura de fibroblastos gengivais de ratos

Para estes ensaios, 2 x 10^4 células foram plaqueadas em cada poço de placas de cultura de 96 poços em meio de cultura celular contendo 50 ng/ml de anfotericina B e 10% de soro fetal bovino acrescido de diferentes concentrações de CSA (50, 100, 250, 500 e 1000 ng/ml). Depois de 4 dias de incubação em meio com soro fetal bovino, este foi substituído por meio sem soro (porém, mantendo-se as concentrações de CSA) e condicionado por um período de 24 h, quando foi recolhido e utilizado para realização de zimogramas. Como pode ser observado na figura 6, o meio condicionado por fibroblastos gengivais humanos apresentou uma enzima com atividade gelatinolítica principal, com cerca de 66 kDa, que sofreu uma inibição de sua atividade degradativa com a adição da CSA no meio de cultura. Este efeito foi dose dependente, ou seja, à medida que a concentração da droga aumentou, a atividade enzimática diminuiu. A canaleta identificada pela letra I mostra a inibição da atividade desta enzima pela adição de 1,10- fenantrolina no meio de cultura, comprovando que esta atividade gelatinolítica provém de uma MMP.

Após o isolamento das linhagens puras de fibroblastos gengivais de ratos, o mesmo ensaio com CSA previamente descrito para culturas de fibroblastos gengivais humanos, foi realizado. Neste experimento pudemos observar uma banda gelatinolítica proeminente,

também com aproximadamente 66 kDa, que teve sua atividade inibida, de maneira dose dependente, pelo uso desta droga imunossupressora (figura 7). A atividade desta enzima também foi completamente inibida pela adição de 1,10- fenantrolina no tampão de incubação do zimograma (figura 7, canaleta indicada pela letra I).

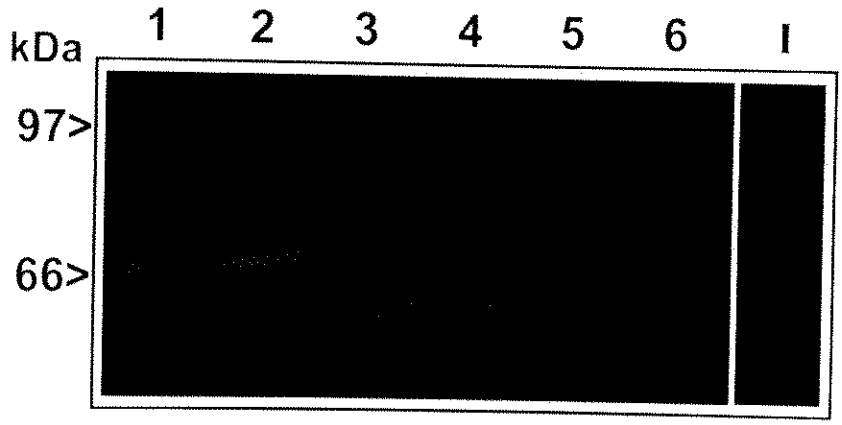

Figura 6: Atividade enzimática do meio de cultura condicionado por fibroblastos gengivais humanos (GCN 3) tratados com diferentes concentrações de CSA. Na canaleta 1 temos o meio controle proveniente de células não tratadas com CSA e nas canaletas de 2 a 6 as seguintes concentrações da droga no meio de cultura: 50, 100, 250, 500 e 1000 ng/ml. Repare a evidente inibição da atividade enzimática da banda gelatinolítica de cerca de 66 kDa (provavelmente MMP-2) secretada no meio de cultura, à medida que aumenta a concentração de CSA. A canaleta representada pela letra I, realizada com amostra de meio condicionado por fibroblastos gengivais humanos (GCN 3) sem tratamento com CSA, mostra a completa inibição da atividade gelatinolítica após a incubação com 0,5mM de 1,10-fenantrolina.

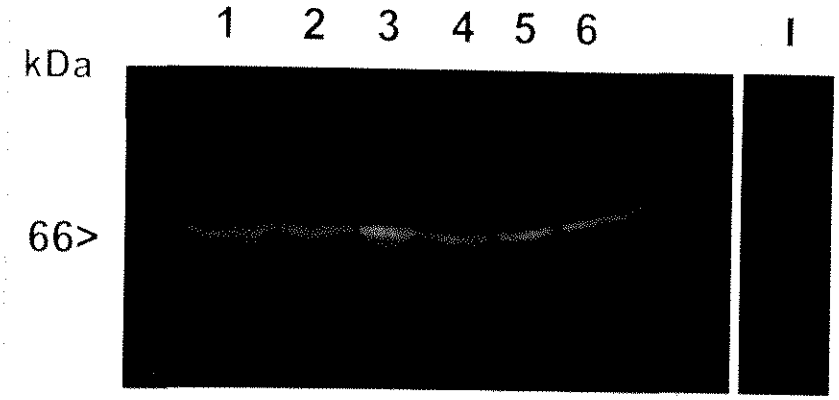

Figura 7: Efeito da CSA sobre a atividade gelatinolítica do meio de cultura celular condicionado por fibroblastos provenientes da gengiva de incisivos de rato. A canaleta 1 mostra o controle com meio condicionado por células não tratadas com CSA; as canaletas de 2 a 6 mostram a atividade do meio contendo concentrações crescentes de CSA (50; 100; 250; 500 e 1000ng/ml). Podemos observar neste ensaio bandas gelatinolíticas com cerca de 66 kDa, correspondentes provavelmente à MMP-2, que tiveram a intensidade reduzida pela adição de concentrações crescentes de CSA no meio de cultura. A canaleta indicada pela letra I, realizada com amostra de meio condicionado por fibroblastos gengivais da região de incisivos de rato sem tratamento com CSA, mostra a completa inibição da atividade enzimática pela 1,10-fenantrolina no tampão de incubação do zimograma.

7.4- Análise da Produção das MMPs por Fibroblastos Gengivais Humanos em Cultura:

Para caracterizar as MMPs sintetizadas e secretadas para o meio de cultura por fibroblastos gengivais, foram realizados ensaios de western blot utilizando-se anticorpos policlonais específicos contra as MMPs 1, 2, 3 e 9. Conforme mostra a figura 8 A, detectamos somente a secreção de MMP-1 e MMP-3, as quais foram evidenciadas como bandas nítidas, com massa molecular de 45 – 50 kDa e 55 – 57 kDa, respectivamente, ao passo que as MMPs 2 e 9 não puderam ser observadas no meio de cultura. Como controle do experimento, realizamos as mesmas reações de western blot em extratos protéicos de fibroblastos, nos quais nenhuma das enzimas em questão puderam ser detectadas (figura 8 B), confirmando que estas são totalmente secretadas para o ambiente extracelular e não armazenadas, como ocorre por exemplo, com a MMP-8 dos neutrófilos polimorfonucleares.

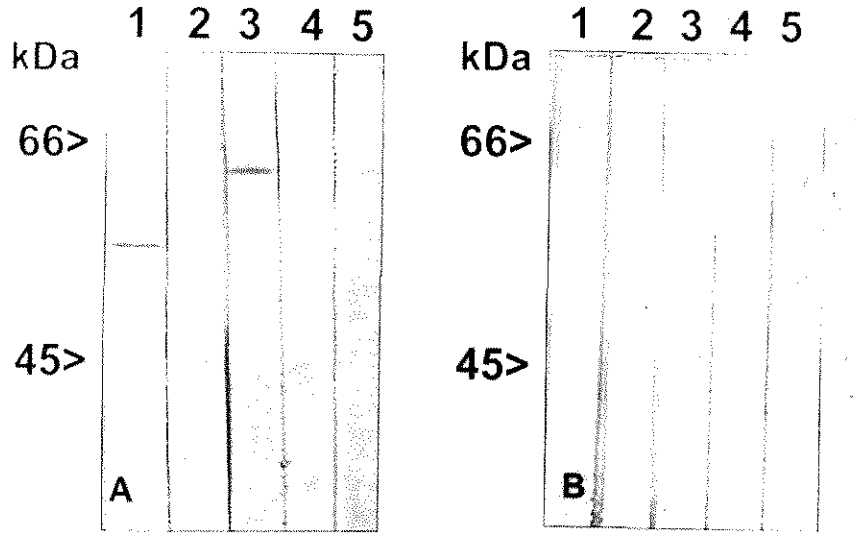

Figura 8: Análise da produção de MMPs por fibroblastos gengivais humanos da linhagem GCN 2 em cultura através de western blot. Em A observamos bandas correspondentes a MMP-1 (canaleta 1) e MMP-3 (canaleta 3), detectadas no meio de cultura condicionado. As MMPs 2 (canaleta 2) e 9 (canaleta 4), não foram observadas no meio de cultura. Em B observamos reações de western blot negativas para as MMPs 1 (canaleta 1), 2 (canaleta 2), 3 (canaleta 3) e 9 (canaleta 4) nos extratos protéicos celulares, demonstrando que estas enzimas não são armazenadas no ambiente intracelular. Canaletas 5A e 5B representam o controle negativo com soro normal de carneiro.

Tendo-se em vista os resultados mostrados na figura 8, decidimos avaliar o efeito do tratamento com CSA sobre a produção das MMPs 1 e 3 em 7 diferentes linhagens de culturas primárias de fibroblastos (GCN 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) provenientes da gengiva de pacientes normais. O mesmo protocolo usado para verificar a atividade gelatinolítica do meio de cultura de fibroblastos tratados com CSA foi repetido e, ao invés dos meios serem usados em zimogramas, eles foram separados eletroforeticamente em SDS - PAGE a 10% e transferidos para membranas de nitrocelulose, as quais foram então incubadas com os anticorpos anti- MMPs 1 e 3.

Nos ensaios onde usamos os anticorpos contra colagenase de fibroblastos (MMP-1) podemos observar que ocorreu uma acentuada redução na produção da MMP-1 pelos fibroblastos gengivais GCN 3, a medida que a concentração da CSA no meio de cultura aumentou até a concentração de 250 ng/ml (figura 9). Nesta linhagem celular, em concentrações superiores a esta (500 ng e 1000 ng/ml) o meio de cultura condicionado passou a conter quantidades maiores da enzima, embora ainda menores que as do meio controle, proveniente de fibroblastos não tratados com CSA. As figuras de 10 a 15 mostram o mesmo experimento realizado nas linhagens celulares GCN 1, 2, 4, 5, 6 e 7. Assim como pode ser observado na figura 9, a figura 11 mostra uma redução da intensidade das bandas de MMP-1, à medida

que a concentração de CSA no meio de cultura aumenta. Entretanto, nas figuras 10, 12, 13, 14 e 15, este fato não foi tão evidente. As diferenças obtidas através da densitometria de cada uma das bandas foram estatisticamente significantes em comparação com as células não tratadas, com relação a produção de MMP-1 (figura 16).

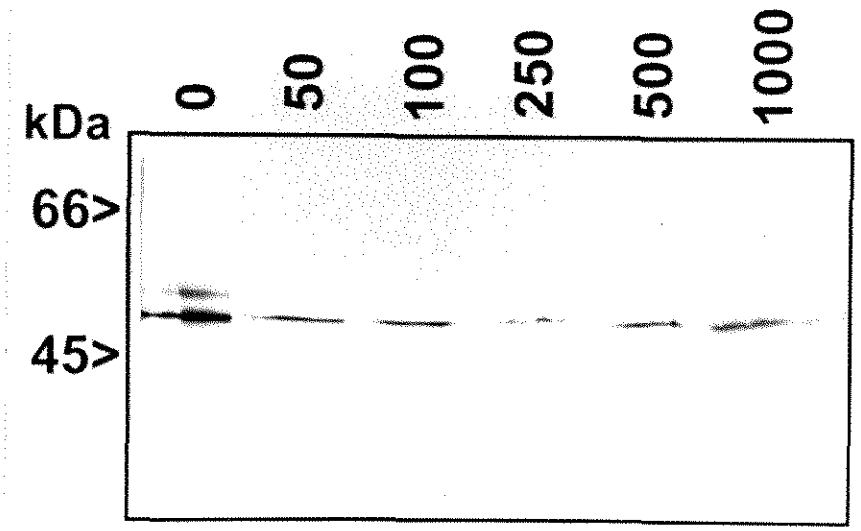

Figura 9: Ensaio de western blot com proteínas do meio de cultura de fibroblastos gengivais humanos (GCN 3) tratados com CSA, incubados com anticorpos anti- MMP-1. Podemos observar uma diminuição na quantidade desta enzima no meio de cultura à medida que a concentração de CSA aumenta até 250 ng/ml, quando comparadas com o meio controle, sem CSA. Observamos um discreto aumento na produção desta enzima nas concentrações de 500 e 1000 ng de CSA/ml de meio.

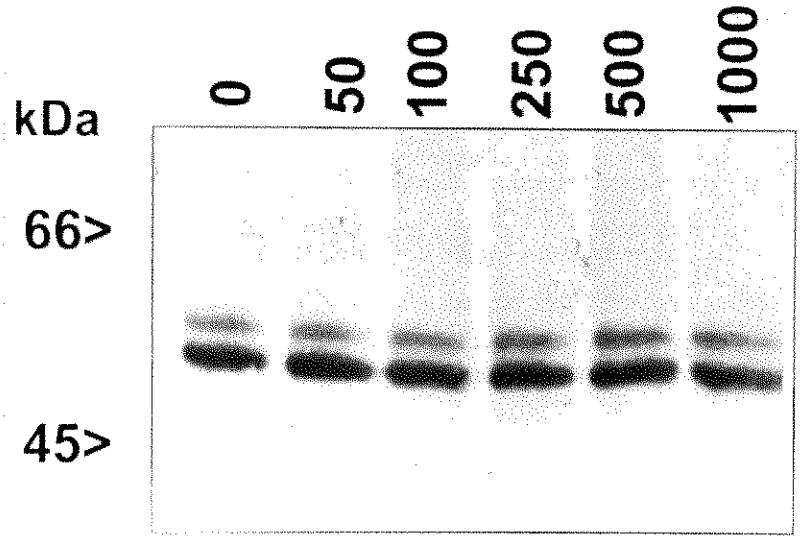

Figura 10: Experimento semelhante ao mostrado na figura anterior, realizado com meio de cultura condicionado por fibroblastos gengivais humanos da linhagem GCN 2. Podemos observar aqui que a CSA praticamente não alterou a quantidade de MMP-1 imunodetectável no meio de cultura, embora na concentração de 1000 ng/ml haja uma discreta inibição.

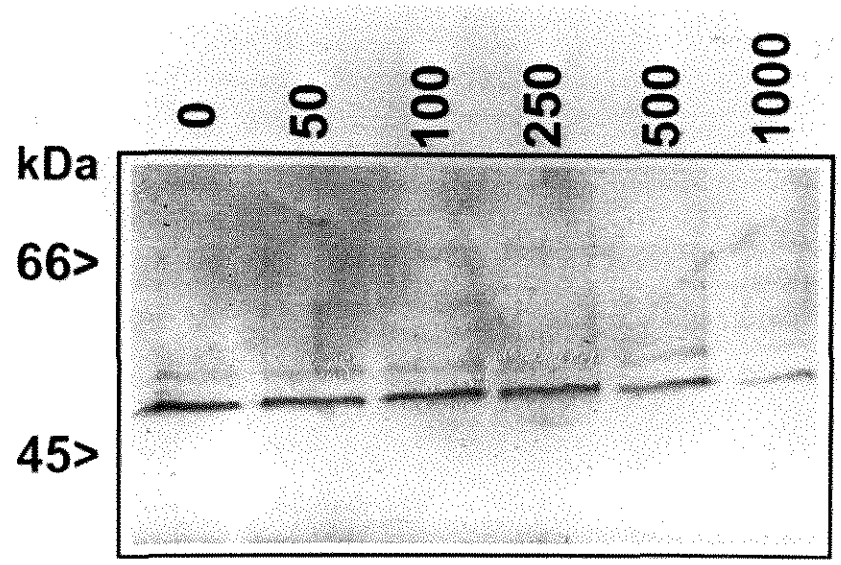

Figura 11: Experimento semelhante ao descrito nas figuras 9 e 10 usando anticorpos anti- MMP-1 e a linhagem de fibroblastos gengivais humanos número 4 (GCN 4). Nota-se aqui uma evidente inibição da produção de MMP-1 à medida que a concentração de CSA aumenta.

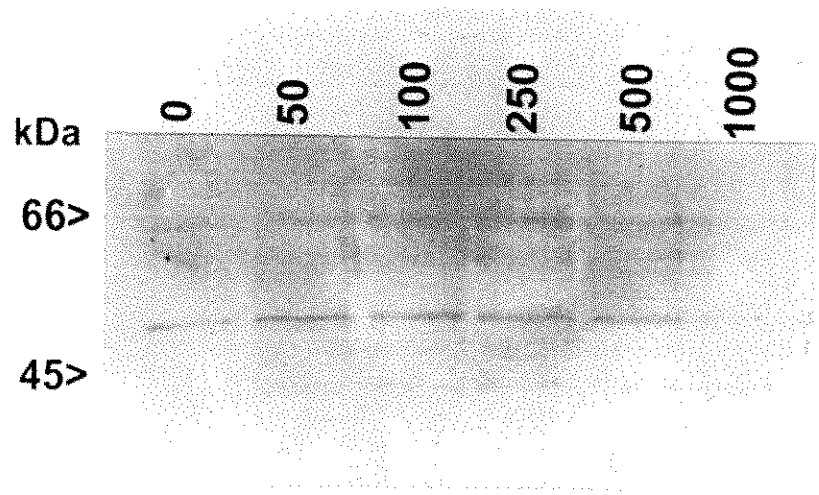

Figura 12: Western blot utilizando anticorpos anti- MMP-1 no meio de cultura condicionado por fibroblastos gengivais humanos da linhagem GCN 1, tratados ou não com CSA, no qual a inibição da secreção de MMP-1 não foi tão evidente.

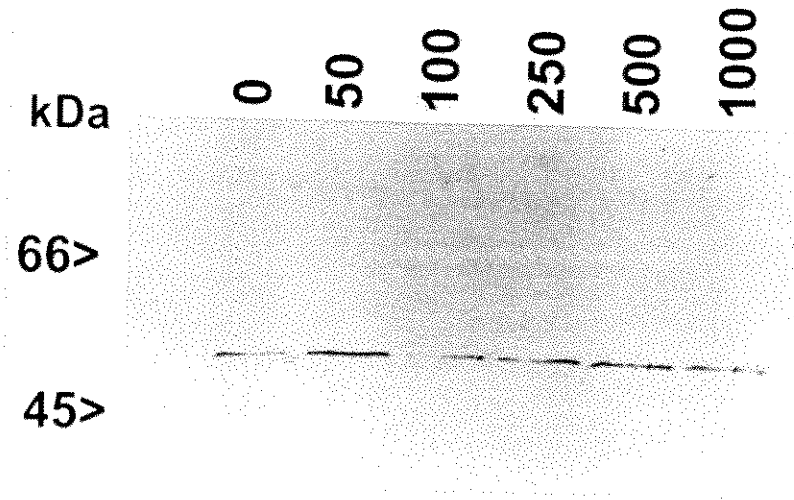

Figura 13: Fibroblastos gengivais humanos (GCN 5) usados em experimento semelhante ao mostrado na figura anterior, no qual a inibição da secreção de MMP-1 foi também evidente, principalmente nas concentrações de 100 e 250 ng/ml de CSA.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

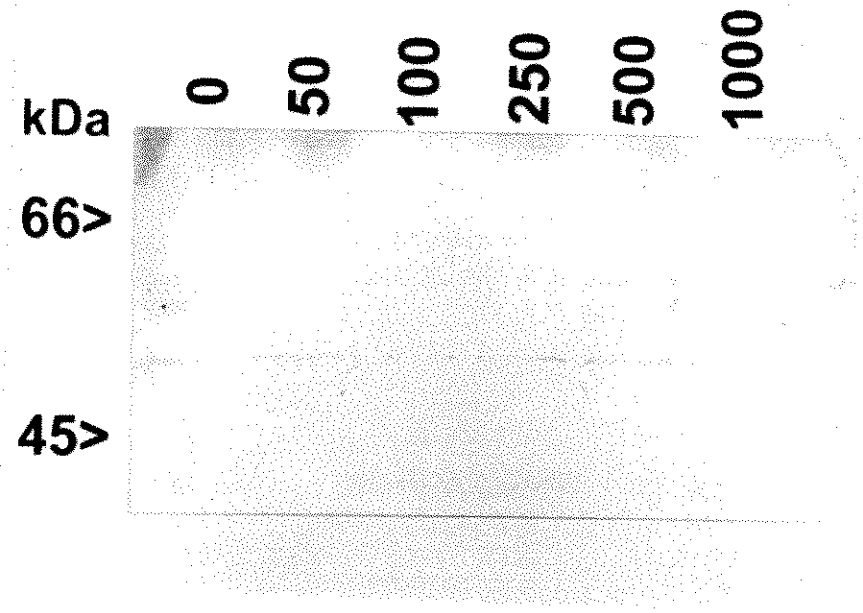

Figura 14: Efeito da CSA na produção de MMP-1 pela linhagem de fibroblastos gengivais humanos número 6 (GCN 6),analisado por western blot com o soro anti– MMP-1. As bandas presentes correspondendo à colagenase de fibroblasto, com cerca de 55 – 57 kDa, apresentam evidente inibição na sua intensidade, à medida que a dose da CSA aumenta a partir do controle que corresponde ao meio condicionado por células não tratadas com CSA.

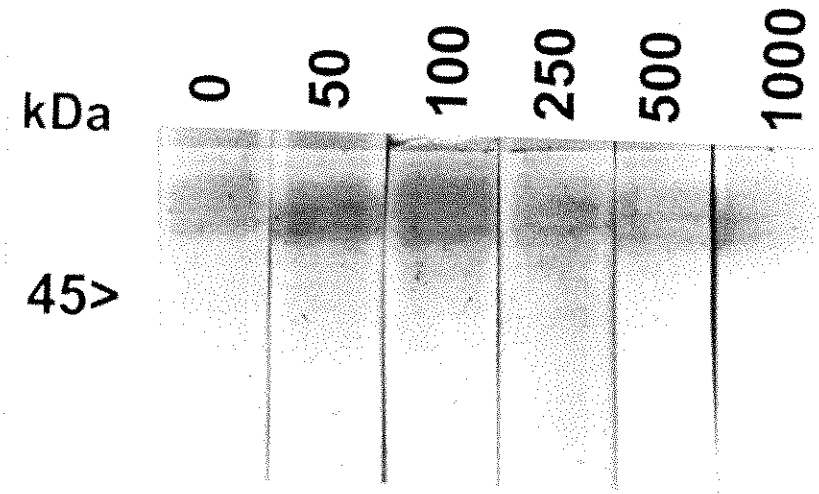

Figura 15: Mesmo experimento mostrado na figura anterior, analisando o efeito da CSA sobre a produção da MMP-1 na linhagem de fibroblastos gengivais humanos normais número 7 (GCN 7). Observamos uma inibição pouco evidente da secreção de MMP-1 nesta linhagem.

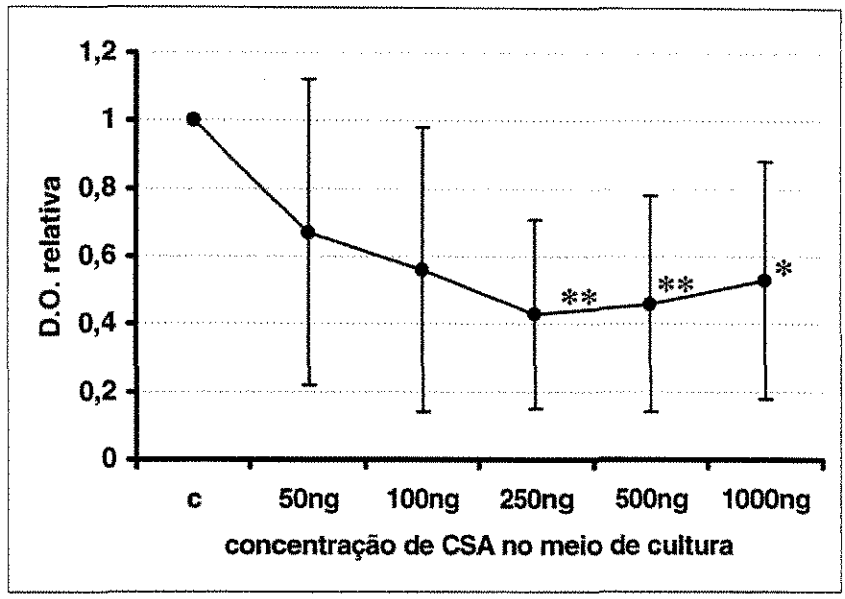

Figura 16: Análise densitométrica das bandas correspondentes à MMP-1 obtidas dos western blots, através do densitômetro BIORAD modelo GS-700. A inibição da produção desta enzima foi estatisticamente significante (teste não paramétrico de Mann - Whitney para as concentrações de 250 - 1000 ng CSA/ml de meio de cultura.

(* $p<0,05$; ** $p<0,01$; barras = desvios padrões)

Nas figuras 17 a 23 observamos as bandas correspondentes à estromelisina-1 (MMP-3) com cerca de 57kDa, no meio de cultura das GCN 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7. Podemos notar que nas figuras 17, 18, 19, 21, 22 e 23 houve uma redução visível da intensidade das bandas correspondentes à MMP-3, principalmente entre 100 a 250 ng/ml de meio. No western blot da figura 20 observamos uma discreta inibição da produção de MMP-3, à medida que aumenta a concentração de CSA e na figura 21, o mesmo experimento realizado na linhagem GCN 5, a redução ocorreu próxima às concentrações de 500 a 1000 ng de CSA/ml de meio. Nos experimentos mostrados nas figuras 21 e 22, decidimos testar o efeito da concentração de 25 ng/ml de CSA no meio de cultura sobre a produção de MMP-3. Entretanto, estes resultados não foram incluídos na análise estatística. A linhagem celular GCN 4 (figuras 20) não mostrou efeito da CSA sobre a quantidade de MMP-3 detectada no meio de cultura. Os resultados estatísticos obtidos da análise densitométrica das bandas de MMP-3 foram significantes, demonstrando que ocorre uma inibição na produção desta enzima pela adição de CSA no meio de cultura (figura 24).

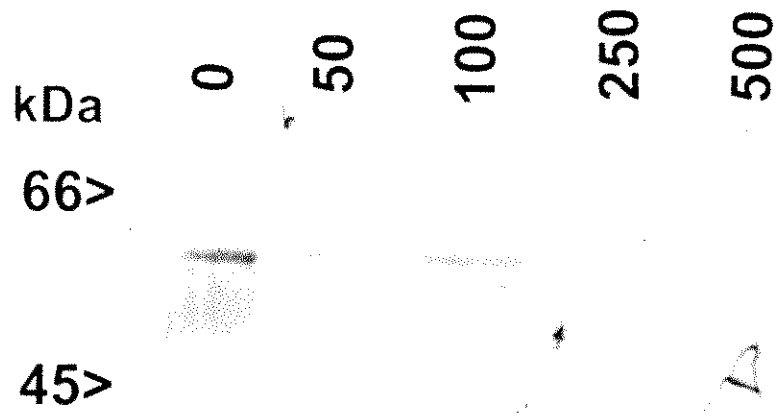

Figura 17: Efeito da CSA na secreção de estromelisina (MMP-3) para o meio de cultura, na linhagem de fibroblastos gengivais humanos normais número 1 (GCN 1), analisado por western blot utilizando anticorpos policlonais anti– MMP-3. As duas bandas presentes correspondem a estromelisina (pró-MMP-3 e MMP-3), onde notamos uma visível inibição de sua secreção proporcionalmente ao aumento da concentração de CSA, até a concentração de 500 ng/ml de meio de cultura.

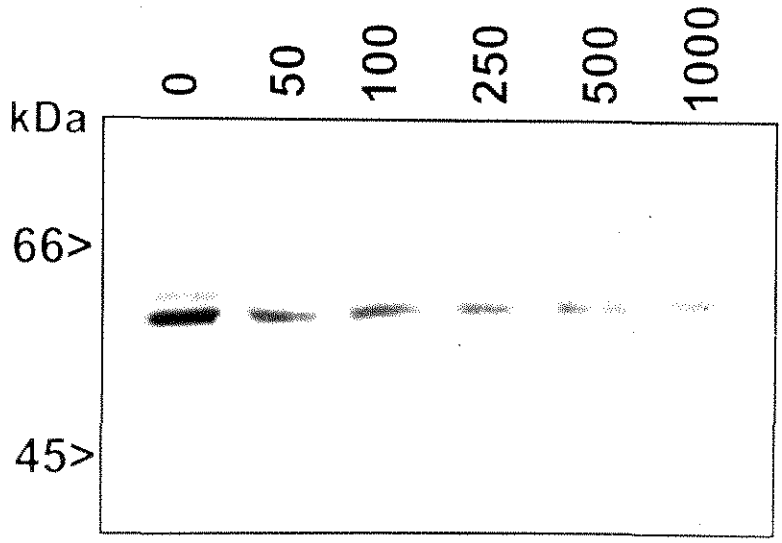

Figura 18: Meio de cultura condicionado por fibroblastos gengivais humanos da linhagem número 2 (GCN 2) em experimento semelhante ao descrito na figura anterior. Observamos novamente uma visível inibição da produção da MMP-3, à medida que há o aumento da concentração de CSA.

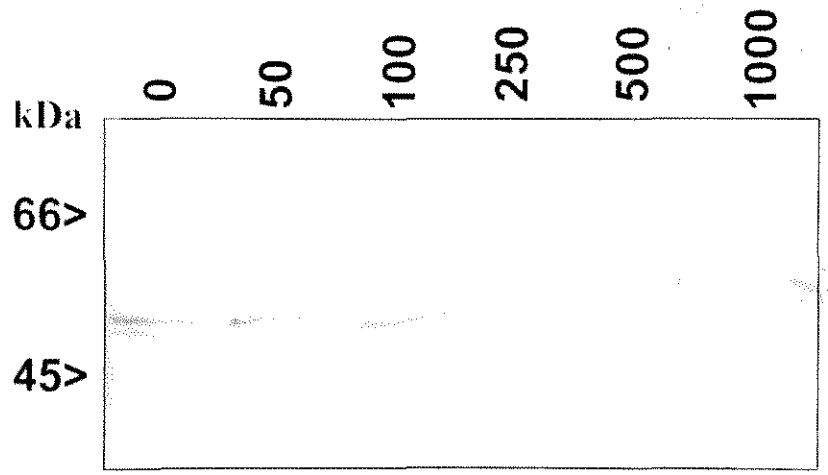

Figura 19: Experimento semelhante ao mostrado na figura anterior, realizado com outra linhagem de fibroblastos gengivais humanos (GCN 3). Podemos observar que, nesta linhagem celular, houve uma discreta redução da produção de MMP-3 pela CSA.

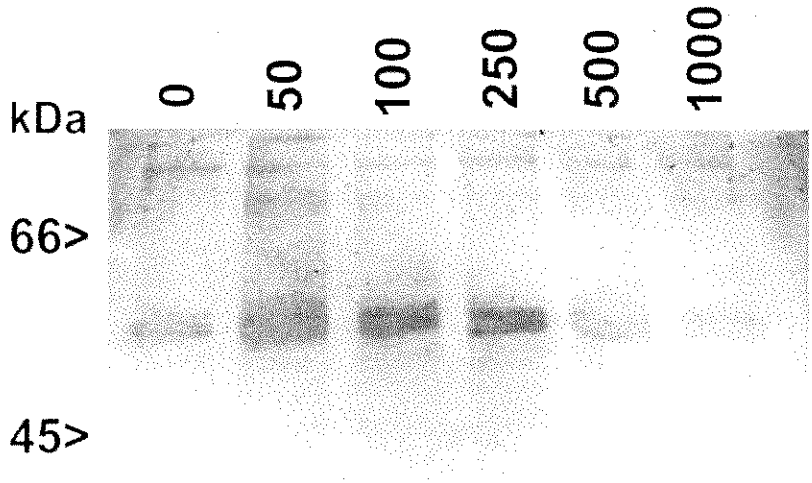

Figura 20: Western blot realizado com anticorpos anti- MMP-3 em outra linhagem de fibroblastos gengivais humanos (GCN 4) mostrando que, nestas células, praticamente não houve efeito da CSA na produção de MMP-3.

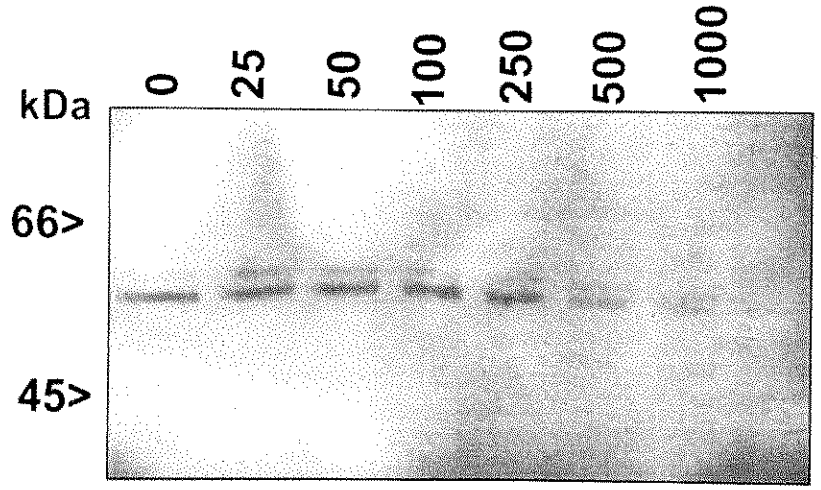

Figura 21: Ensaio de western blot utilizando anticorpo policlonal anti- MMP-3 realizado com meio de cultura condicionado da linhagem de fibroblastos gengivais humanos normais número 5 (GCN5). As bandas visíveis correspondem à estromelisina (pró-MMP-3 e MMP-3). Podemos observar que houve inibição da produção de MMP-3 pelos fibroblastos à medida que a concentração de CSA aumenta a partir do controle, que corresponde ao meio de células não tratadas com a droga. Foi incluída a concentração de 25 ng/ml para verificarmos o efeito de uma concentração menor de CSA na inibição da secreção desta enzima.

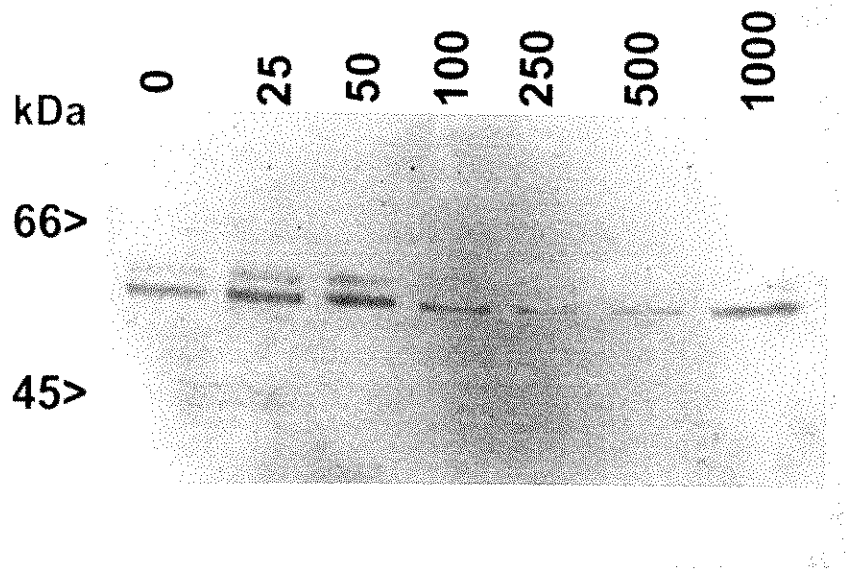

Figura 22: Experimento semelhante ao mostrado na figura anterior, realizado com outra linhagem de fibroblastos gengivais humanos (GCN 6). Observamos neste ensaio de western blot com anticorpo anti- MMP-3 a influência da CSA sobre a produção desta enzima. Houve uma diminuição na quantidade de estromelisina-1 secretada no meio de cultura, principalmente nas concentrações de 250 e 500 ng de CSA/ml de meio e um discreto aumento na quantidade desta enzima na concentração de 1000ng/ml. A concentração de 25 ng/ml foi novamente testada nesta linhagem.

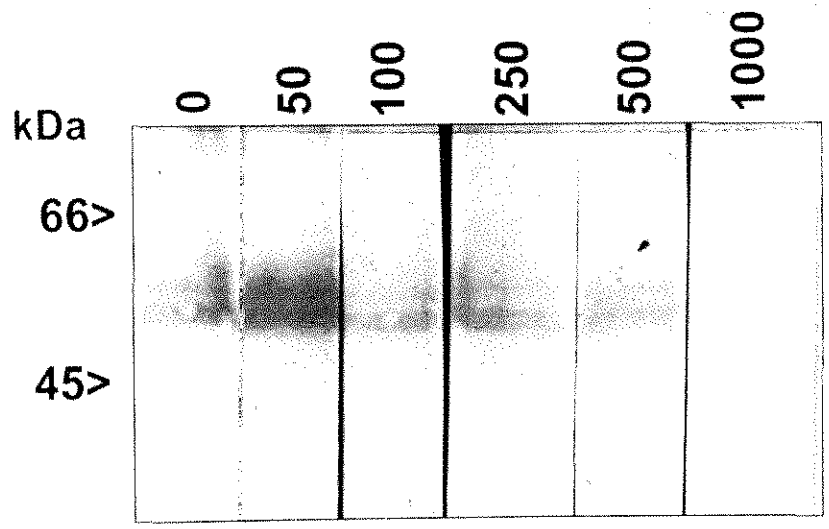

Figura 23: Western blot com anticorpos primários anti-MMP-3 na linhagem número 7 de fibroblastos gengivais humanos (GCN 7). Novamente observamos que as bandas correspondentes MMP-3 ficam menos intensas à medida que a concentração de CSA aumenta.

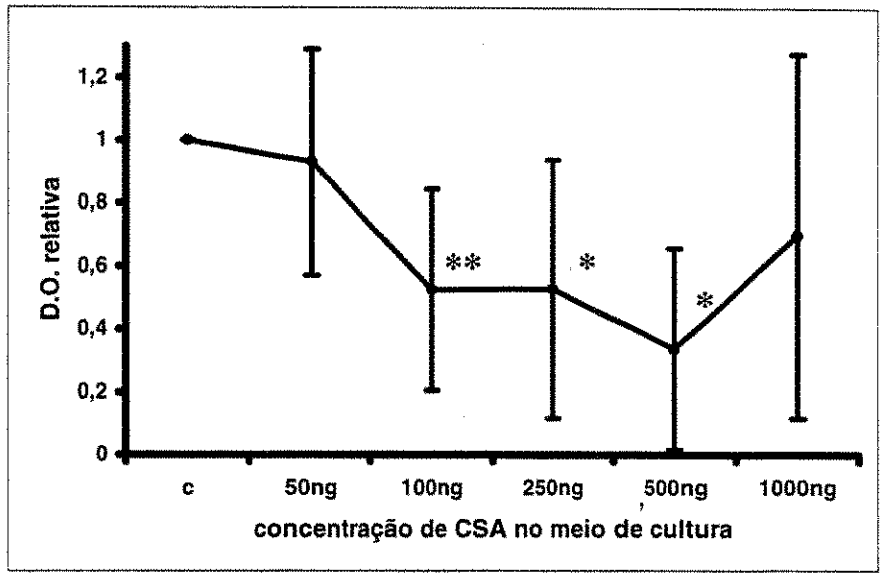

Figura 24: Análise densitométrica das bandas correspondentes à MMP-3. Os western blots foram estudados em um densitômetro BIORAD modelo GS-700 e os valores de DO obtidos nas canaletas das células tratadas com CSA divididos pelo valor de DO do controle de cada experimento, para normalização. As diferenças na intensidade das bandas sob a ação da CSA foram significativas pelo teste não paramétrico de Mann – Whitney.

(* $p<0,05$; ** $p<0,01$, barras = desvios padrões).

7.5- Análise da Atividade Caseinolítica do meio de cultura de Fibroblastos Gengivais:

A atividade enzimática da estromelisina –1 (MMP-3) foi analisada através de zimogramas tendo 0,5 mg/ml de caseína como substrato e 35 ug de proteína total aplicadas em cada canaleta. Nesses experimentos pudemos observar 2 bandas negativas indicando a degradação da caseína contida no gel, provavelmente correspondentes à pró-MMP-3 e MMP-3, com massa molecular estimada em 55 - 60 kDa (figura 25). Nós não conseguimos detectar diferenças na degradação da caseína nos meios de cultura provenientes de fibroblastos tratados com CSA. Estas diferenças foram provavelmente mascaradas pela grande sensibilidade da técnica de zimograma frente à massa protéica utilizada por canaleta, o que pode ter causado a saturação das bandas.

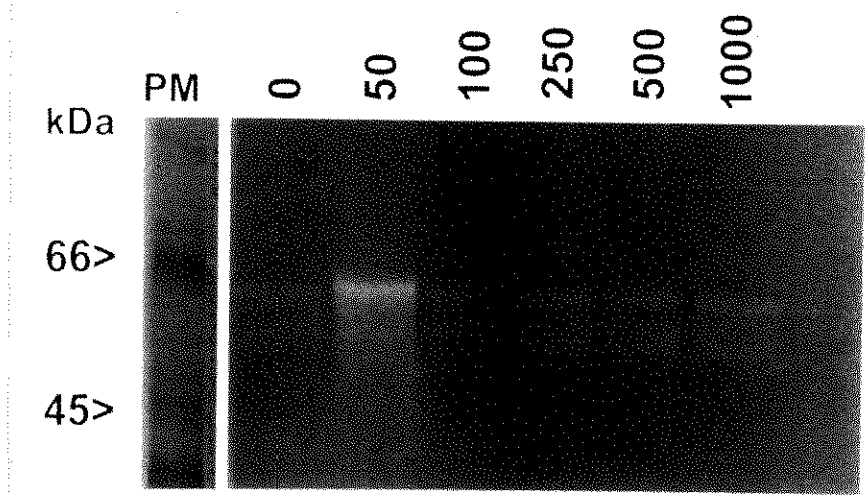

Figura 25: Efeito da CSA sobre a atividade caseinolítica do meio de cultura condicionado por fibroblastos provenientes da gengiva humana normal. As canaletas de 50 a 1000 ng/ml mostram a atividade do meio contendo concentrações crescentes de CSA. Observamos neste ensaio que não houve inibição na atividade da MMP-3, nas diferentes concentrações de CSA utilizadas. As bandas foram mais evidentes na concentração de 50 ng/ml.

7.6- Detecção de Colágeno Tipo I em Culturas Primárias de Fibroblastos Tratados com CSA:

Para verificar se a inibição na quantidade de MMP-1 e MMP-3 secretadas por fibroblastos gengivais sob a ação da CSA estaria relacionada com um acúmulo anormal de colágeno tipo I na matriz extracelular, utilizamos os extratos protéicos totais, feitos a partir destas células. Como podemos observar na figura 26, a intensidade das bandas correspondentes às cadeias $\alpha 1$ do colágeno tipo I, obtidas através de reação de western blot, é maior nos extratos provenientes de células tratadas com maiores concentrações de CSA.

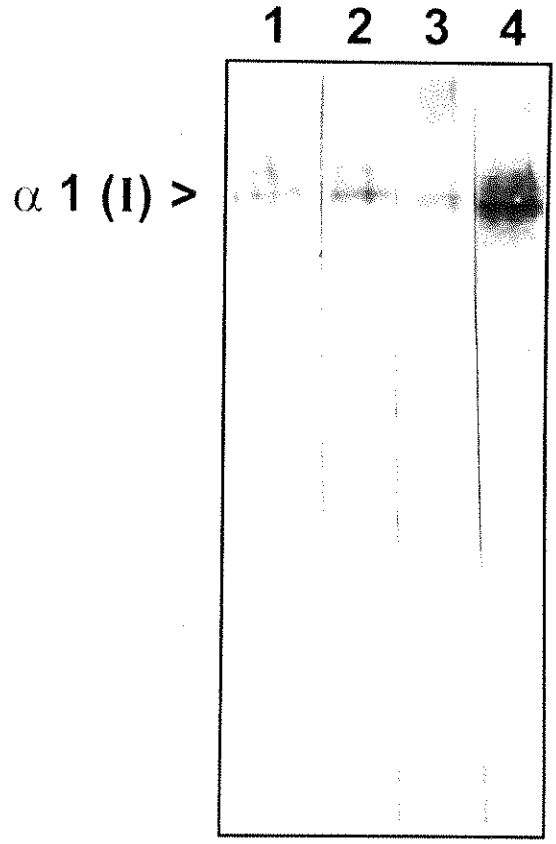

Figura 26: Efeito da CSA na quantidade de colágeno tipo I em cultura de fibroblastos gengivais humanos tratados com CSA, observado através de reação de western blot. Canaleta 1, sem CSA; canaleta 2, células tratadas com 100 ng de CSA/ml; canaleta 3, 500 ng de CSA/ml e canaleta 4, 1000 ng de CSA/ml. Podemos observar que a intensidade das bandas correspondentes às cadeias α 1 do colágeno tipo I é maior em 1000 ng/ml de CSA (canaleta 4).

7.7- Imunoprecipitação:

Na tentativa de padronizarmos um experimento para a detecção da atividade da MMP-1, cujas bandas gelatinolíticas não são evidentes nos zimogramas normais, realizamos reações de imunoprecipitação com os mesmos anticorpos anti- MMP-1 utilizados nos western blots. Usando os meios de cultura condicionados por fibroblastos tratados com 250, 500 e 1000 ng de CSA/ml de meio, observamos bandas gelatinolíticas na altura de 45 e 50 kDa, que provavelmente correspondem ao zimogênio e à forma ativada da MMP-1. Outras bandas na altura de 66 kDa também foram evidentes, entretanto estas também apareceram nos controles com soro normal (figura 27). Aparentemente, houve uma atividade discretamente maior da MMP-1 no meio das células controle, se comparada com o meio proveniente das células tratadas com CSA, particularmente na concentração de 1000 ng/ml de meio. A figura 28 mostra os sobrenadantes tratados com soro normal de cabra ou anti- MMP-1, ambos com atividade gelatinolítica intensa. Novos experimentos precisam ainda ser realizados para padronizar esta imunoprecipitação de MMP-1 e verificar sua utilidade na análise da atividade desta enzima sob a ação da CSA.

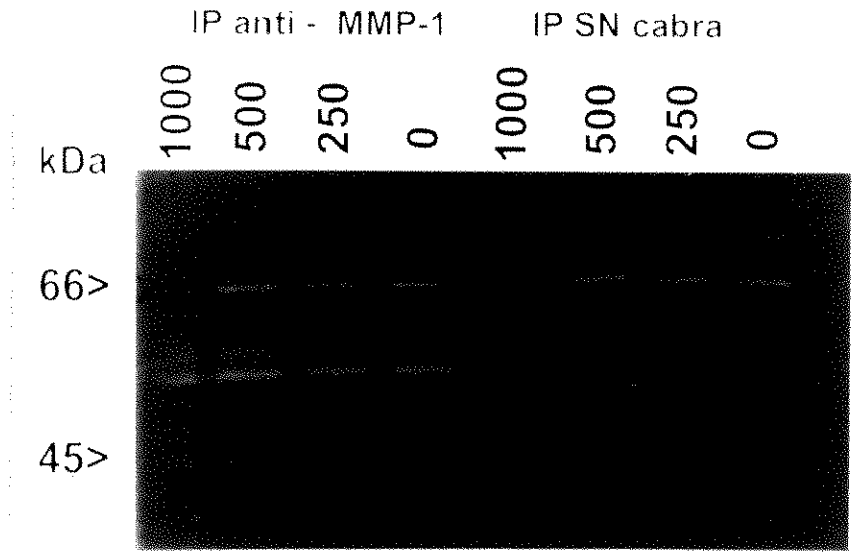

Figura 27: Análise zimográfica dos imunoprecipitados obtidos com anticorpos anti – MMP-1 e com soro normal de cabra. Se compararmos os grupos entre si observamos que houve uma maior atividade enzimática na altura de 52 - 57 kDa nas amostras incubadas com soro anti– MMP-1. Podemos observar também que nos grupos incubados com anti-MMP-1 houve uma ligeira inibição da atividade gelatinolítica imunoprecipitada, conforme aumentou a concentração de CSA no meio.

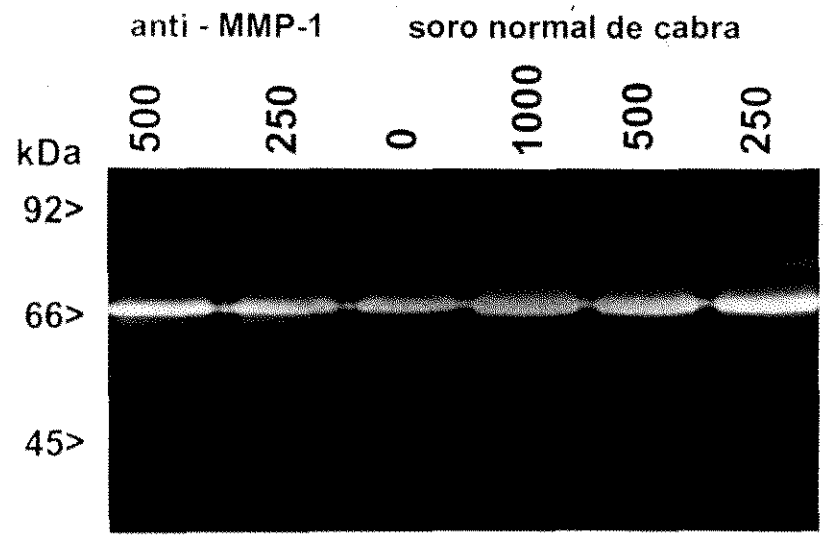

Figura 28 Análise enzimática dos sobrenadantes obtidos no experimento descrito na figura anterior. Podemos observar que houve uma intensa atividade gelatinolítica nos sobrenadantes, tanto dos controles com soro normal de cabra como nas amostra incubadas com anti- MMP-1, mostrando que as enzimas não foram depletadas do meio de cultura pelos anticorpos anti- MMP-1.

DISCUSSÃO

8-DISCUSSÃO:

O mecanismo de ação da CSA no aumento gengival ainda é incerto e os dados existentes na literatura conflitantes. Entretanto, postula-se que ocorra uma estimulação na proliferação de algumas populações de fibroblastos, um aumento da síntese de proteínas da matriz extracelular ou ainda uma inibição da atividade das MMPs. Na verdade, todos estes fatores podem atuar simultaneamente, em maior ou menor grau, dependendo do caso.

Os vários estudos existentes até o momento, explorando os mecanismos de ação da CSA sobre o índice de proliferação de fibroblastos, sua síntese protéica e atividade colagenolítica têm produzido resultados controversos. Tem sido relatado que a CSA afeta os níveis de proliferação de fibroblastos (BARTOLD, 1988; ONO et al.,1991; WILLERSHAUSEN-ZÖNNCHEN et al.,1992; MARIOTTI et al.,1998). BARTOLD, estudando fibroblastos gengivais humanos, observou uma inibição da proliferação dessas células quando expostas a IL-1β, assim como uma estimulação da proliferação destas na presença de CSA, na concentração de 100 ng/ml. Alguns estudos *"in vitro"* têm demonstrado a influência da CSA estimulando a proliferação de sub-populações de fibroblastos (ZEBROWSKY et al.,1986; COLEY et al.,1986). Outros autores sugeriram que *"in vivo"*

a ciclosporina não influencia diretamente o metabolismo dos fibroblastos, atuando através de vias indiretas, associadas à liberação de mediadores da inflamação ou produtos bacterianos. Enfatizaram ainda que o aumento gengival induzido pela ciclosporina ocorre, com maior freqüência, em regiões onde há um maior índice de placa bacteriana e consequentemente maior grau de inflamação (JAMES et al.,1995).

MARIANI et al. (1996) observaram um aumento na síntese e deposição de glicosaminoglicanos sulfatados e não sulfatados no tecido gengival de pacientes sob tratamento com CSA e também em cultura primária de fibroblastos gengivais humanos, tratados com esta droga. Síntese aumentada de glicosaminoglicanos induzida pela CSA também foi detectada por NEWEL e IRWIN (1997). Recentemente, AYANOGLOU e LESTY (1999) demonstraram que, em ratos, o aumento gengival induzido pela CSA é caracterizado por vasodilatação, aumento do volume da matriz extracelular e aumento da espessura epitelial. SCHINCAGLIA et al. (1992), estudando o efeito da CSA em fibroblastos gengivais humanos relataram que há um aumento significante na síntese protéica e que os níveis de RNAm para colágeno tipo I, assim como de moléculas de procolágeno tipo I foram maiores nas células tratadas com CSA, nas concentrações de 100, 500 e 1000 ng/ml, do que nas células controle. Segundo estes

mesmos autores, os níveis de procolágeno tipo I aumentados poderiam estar relacionados com a degradação reduzida de procolágeno, com um aumento da secreção desta molécula ou ainda com o aumento da sua síntese. Também estudando o efeito da CSA sobre a síntese protéica, GHIGGERI et al. (1994) observaram um aumento na síntese de colágeno tipo III por fibroblastos renais em cultura primária estimulados com 5ug/ml de CSA no meio de cultura. Por outro lado, ZEBROWSKI et al. (1994) relataram que concentrações entre 0,25 e 0,5 ug/ml de CSA não afetam a síntese de proteínas colagênicas e sugeriram que o aumento de concentrações de glicosaminoglicanos não sulfatados na matriz extracelular pode ter um papel significante no processo do aumento gengival. Já segundo SPOLIDÓRIO (1996), o aumento gengival induzido pela CSA em ratos apresenta maior quantidade de fibroblastos e de fibras colágenas, em relação à gengiva normal. FISCHER et al. (1989) mostraram que a ligação de CSA inibe a ação das ciclofilinas e que estas podem influenciar na síntese de colágeno, entretanto, maiores estudos neste sentido se fazem necessários para comprovar esta hipótese.

Com relação aos efeitos da CSA sobre as MMPs, os dados existentes na literatura também são escassos. LOHI et al. (1994) observaram que fibroblastos provenientes da pele humana, em cultura, aumentam a expressão de MMP-1 sob ação da CSA, ao

passo que os mensageiros para MMP-2 e 9 não se alteram. Entretanto, deve-se ressaltar que nestes experimentos os fibroblastos foram também tratados com éster de forbol, IL-1β e TNF-α, o que pode ter mascarado os efeitos da CSA. Recentemente, SUGANO et al. (1998) demonstraram claramente que a CSA inibe a expressão gênica da MMP-1 por fibroblastos gengivais humanos. Já HEMPELMANN et al. (1991) detectaram uma redução na liberação de colagenase de neutrófilos (MMP-8) sob o efeito da CSA. Analisando cortes histológicos de pacientes transplantados e tratados com CSA através de imunofluorescência, THOMASON et al. (1998) relataram uma redução na quantidade de MMP-1 no conjuntivo gengival, quando comparados com pacientes não tratados com a droga. Os resultados destes últimos autores estão de acordo com os de SUGANO et al. (1998).

Segundo TEN CATE (1971), a remodelação do tecido conjuntivo envolve um equilíbrio entre a síntese e degradação de colágeno. O acúmulo de colágeno pode resultar de um estímulo na sua síntese e/ou diminuição da sua degradação. De acordo com TIPTON et al. (1991), o aumento da síntese de colágeno, a baixa produção de colagenase ou ainda o aumento da produção TIMPs, podem levar a uma deposição exagerada de colágeno no tecido gengival. Os mesmos autores relataram ainda que o efeito da CSA sobre a

atividade colagenolítica aparentemente depende do doador da amostra, da presença de sub-populações celulares susceptíveis e também da concentração plasmática da droga. Em 1982, HASSEL demonstrou, através de radioimunoensaios, que fibroblastos de indivíduos com aumento gengival causado por difenilhidantoína produziam grandes quantidades de colagenase, no entanto, esta enzima era pouco eficiente para degradar colágeno *"in vitro"*. Entretanto, havia uma variação substancial entre as linhagens celulares estudadas com relação a quantidade de colagenase sintetizada e secretada. Foi demonstrado ainda, no mesmo trabalho, que a produção de colagenase pelos fibroblastos provenientes de gengivas normais e com aumento gengival diminuía à medida em que a monocamada celular se tornava confluente.

Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que a CSA atua diretamente nos fibroblastos inibindo a produção e a atividade de MMPs, causando um acúmulo de glicoproteínas na matriz extracelular, o que parece ser determinante na patogênese do aumento gengival. Como a concentração plasmática de CSA, em doses terapêuticas, varia normalmente de 70 a 200 ng/ml (DALEY et al., 1986; ROSS et al., 1989), utilizamos em todos os nossos experimentos de cultura celular concentrações semelhantes da droga.

Neste estudo, nós verificamos que a quantidade de MMP-1 e MMP-3 imunoreativas nos meios de cultura condicionados por fibroblastos humanos normais, tratados com diversas concentrações de CSA, é significativamente menor que nos meios provenientes das células controle (figuras 16 e 24). A diminuição da atividade gelatinolítica detectada nos meios de cultura condicionados por fibroblastos gengivais de ratos ou humanos (figuras 2, 6 e 7) pode, teoricamente, ter sido provocada por mecanismo semelhante. É importante ressaltar aqui que as bandas gelatinolíticas, observadas nos zimogramas realizados com meio de cultura condicionado pelas culturas primárias, correspondem a MMP-2 e que esta enzima não foi detectada através de nossas reações de western blot. Isto provavelmente aconteceu: 1-) pela maior atividade das MMP-2 em degradar o colágeno desnaturado ou gelatina, em comparação com as outras MMPs, o que permitiria que uma massa mínima da enzima produzisse bandas degradativas nos zimogramas (MANICOURT e LEFEBVRE, 1993) ou 2-) pela afinidade e especificidade dos anticorpos anti-MMP-2 utilizados, que podem ser menores que a dos anticorpos anti-MMP-1 e MMP-3. Talvez a utilização de um sistema de revelação de western blot mais sensível, como o quimioluminescente, permitisse a detecção de MMP-2 imunoreativa nos meios de cultura condicionados.

Em trabalho recente, SUGANO et al.(1998) demonstraram que a CSA inibe a expressão gênica da MMP-1 em fibroblastos gengivais, através do bloqueio da enzima "C-jun terminal quinase". Nossos resultados mostrando uma reduzida produção de MMP-1 confirmam as observações destes autores. Outros estudos ainda devem ser realizados para verificar os níveis de expressão gênica da MMP-3 sob a ação da CSA.

A literatura tem mostrado que a MMP-3 é um ativador específico e necessário para a atividade enzimática da MMP-1 e MMP-9 (UNEMORI et al.; 1991; KRANE, 1994 e MURPHY et al., 1994). Como nossos resultados indicaram que a CSA inibe a secreção de MMP-3 por fibroblastos gengivais, podemos especular uma participação direta desta enzima na composição da matriz extracelular sob efeito desta droga. A menor quantidade de MMP-3 reduziria o número de moléculas de MMP-1 ativadas e também provocaria acúmulo de outras glicoproteínas, como a fibronectina e também proteoglicanos. Esta idéia faz sentido se levarmos em consideração algumas evidências da literatura mostrando que, na presença de MMP-3, a atividade específica da MMP-1 chega a ser doze vezes maior do que na sua ausência (UNEMORI et al., 1991; KRANE et al., 1994; MURPHY et al., 1994; MURPHY et al., 1987; NAGASE et al., 1991; OGATA et al., 1992). Novos estudos analisando o efeito da CSA na

expressão gênica da MMP-3 no tecido conjuntivo gengival, assim como a capacidade colagenolítica da MMP-1 extraída da gengiva de animais tratados com CSA ou mesmo de fibroblastos gengivais em cultura, são necessários para melhor esclarecer este ponto.

Devido ao efeito da CSA poder também ocorrer na produção de TIMPs, estes podem estar inibindo a ação das MMPs na matriz extracelular (HASSEL, 1982). Um aumento na expressão de IL-6 no tecido gengival de pacientes tratados com CSA foi observado por WILLIANSON et al. (1994). Posteriormente, MYRILLAS et al. (1999) confirmaram este achado, enfatizando que a IL-6 é um potente estimulador dos TIMPs. Resultados obtidos por nosso grupo (COLETTA et al., 1999) mostraram que fibroblastos isolados de pacientes portadores de fibromatose gengival hereditária produzem menor quantidade de RNAs mensageiros para MMP-1 e MMP-2 e maior quantidade de RNAs mensageiros para TIMP 1 e 2 e TGF-β.

Nossos resultados mostram também que ocorre um aumento na quantidade de colágeno tipo I (figura 26) por fibroblastos gengivais humanos em cultura tratados com CSA, de acordo com nossos dados mostrando a maior deposição de colágeno tipo I no tecido gengival de animais tratados com CSA (figuras 3 e 4). Provavelmente, isto é uma das conseqüências da reduzida produção de MMP-1 e MMP-3 demonstrada em nossos western blots, assim como da redução na

atividade gelatinolítica da MMP-2 observada no tecido gengival de ratos tratados com CSA e também no meio de cultura de fibroblastos sob a ação desta droga. Os resultados dos experimentos para análise da quantidade de colágeno tipo I depois da regressão do aumento gengival em ratos não foram conclusivos, havendo a necessidade de novos estudos para esclarecer este ponto.

Em resumo, nossos resultados apontam para um efeito da CSA sobre a atividade e produção das MMPs, o que provavelmente desequilibra o metabolismo fisiológico do colágeno e possivelmente de outras macromoléculas da matriz extracelular do tecido gengival.

CONCLUSÕES

9- CONCLUSÕES:

1- A produção de MMP-1 e MMP-3 por fibroblastos gengivais em cultura é inibida pela CSA em concentrações semelhantes aos níveis séricos da droga, encontrados nos pacientes submetidos a tratamento imunossupressor.

2- A atividade gelatinolítica da MMP-2 é inibida pela CSA no tecido gengival de animais tratados com CSA e em culturas primárias de fibroblastos gengivais humanos e de ratos.

3- A quantidade de colágeno tipo I é maior no tecido gengival de ratos tratados com CSA, assim como na matriz extracelular produzida por fibroblastos gengivais em cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

10-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AIMES,R.T.; QUIGLEY,J.P. Matrix metalloproteinase-2 is na interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and solube native type I collagen generating the specific 3/4 and 1/4-length fragments. J Biol Chem, v. 17, n. 270, p. 5872-6, Mar. 1995.

2. ANGELOPOULOS, A.P. Diphenylhydantoin gingival hyperplasia. A clinicopathological review. Incidence clinical features and histopathology. J Can Dent Assoc, Ottawa, v. 41, n. 2, p. 103-106, Feb. 1975.

3. ARAI,H. *et al.* Response of human gingival fibroblasts to prostaglandins. J Periodontal Res, Copenhagen, v. 30, n. 5, p. 303-311, Sept. 1995.

4. AYANOGLOU, C.M., LESTY, C. Cyclosporin A-induced gingival overgrowth in the rat: a histological, ultrastructural and histomorphometric evaluation. J Periodontal Res, Copenhagen, v. 34, n. 1, p. 7-15, Jan. 1999.

5. BARTOLD, P.M. The effect of interleukin-1 B on hyaluronic acid synthesized by adult humen gingival fibroblasts "in vitro" J Periodontal Res, Copenhagen, v. 23, n. 2, p. 139-147, Mar. 1988.

6. BARTOLD, P.M. Regulation of human gingival fibroblast growth and synthetic activity by cyclosporine-A "in vitro". J Periodontal Res, Copenhagen, v. 24, n. 5, p. 314-321, Sept. 1989.

7. BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. J Periodontol, Chicago, v. 64, n. 5, p. 474-484, May 1993. [Supplement]

8. BONNAURE-MALLET, M., TRICOT-DOLEUX, S., GODEAU, G.J. Changes in extracellular matrix macromolecules in human gingiva after treatment with drugs inducing gingival overgrowth. Arch Oral Biol, Oxford, v. 40, n. 5, p. 393-400, May 1995.

9. BOREL, J.F., FEURER, C., GUBLER, H.V. Biological effects of cyclosporin. A new antilymphocyte agent. Agents Action, Basel, v. 6, n. 4, p. 468-475, July 1976.

10. _____., LAFFERTY, K.J. Cyclosporine: speculation about its mechanism of action. Transplant Proc, Orlando, v. 15, n. 3, p. 1881-1885, Sept. 1983.

11. BUTLER, R.T., KALKWARF, K.L., KALDHAL, W.B. Drug-induced gingival hyperplasia: phenytoin, cyclosporin, and nifedipine. J Am Dent Assoc, Chicago, v. 114, n. 1, p. 56-60, Jan. 1987.

12. CIANCIO, S.G. Clinical experiences with tetracyclines in the treatment of periodontal disease. The N. Y. Academy of Science, p. 132-139, 1994.

13. COLETTA, R.D. Caracterização das metaloproteinases de matriz associadas ao desenvolvimento do germe dental dos primeiros molares de rato. Piracicaba, 1996. 66p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

14. COLETTA, R.D. *et al.* Differential proliferation of fibroblasts cultured from hereditary gingival fibromatosis and normal gingiva. J Periodontal Res, Copenhagen, v. 33, n. 8, p. 469-475, Nov. 1998.

15. _____. *et al.* Alteration in expression of MMP-1 and MMP-2 but not TIMP-1 and TIMP-2 in hereditary gingival fibromatosis is mediated by TGF-β1 autocrine stimulation. J Periodontal Res, Copenhagen, 1999. [no prelo]

16. COLEY, C., JARVIS, K., HASSEL, T. Effect of cyclosporine-A on human gingival fibroblast in vitro. J Dent Res, Washington, v. 65, p. 228-337, 1986. *Apud* SPOLIDÓRIO, L.C. *Op. cit.* Ref. 101.

17. DALEY, T.D., WYSOCKI, G.P., DAY, C. Clinical and pharmacologic correlations in cyclosporine-induced gingival hyperplasia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, Saint Louis, v. 62, n. 4, p. 417-421, Oct. 1986.

18. _____., _____. Cyclosporine therapy its significance to the periodontist. J Periodontol, Chicago, v. 55, n. 12, p. 708-712, Dec. 1984.

19. DELILIERS, G.L. *et al.* Light and electron microscopic study of cyclosporin A-induced gingival hyperplasia. J Periodontol, Chicago, v. 57, n. 12, p. 771-775, Dec. 1986.

20. DONGARI, A., MC DONNELL, H.T., LANGLAIS, R.P. Drug – induced gingival overgrowth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, Saint Louis, v. 76, n. 4, p. 543–548, Oct. 1993.

21. ELLIOTT, J.F. *et al.* Induction of interleukin-2 messeger RNA inhibited by cyclosporin A. Science, Washington, v. 226, n. 4681, p. 1439-1441, Dec. 1984.

22. FAULDS, D., GOA, K.L., BENFIELD, P. Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunoregulatory disorders. Drugs, Auckland, v. 45, n. 6, p. 953-1040, June 1993.

23. FEITOSA, L. *et al.* Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (Loxosceles intermedia) venom. Toxicon, Elmsford, v. 36, n. 7, p. 1039-1051, July 1998.

24. FISCHER, G. *et al.* Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. Nature, London, v. 337, n. 6206, p. 476-478, Feb. 1989.

25. FU, E. *et al.* Dose-dependent gingival overgrowth induced by cyclosporin in rats. J Periodontol, Chicago, v. 66, n. 7, p. 594-598, July 1995.

26. GELFAND, E.W., CHEUNG, R.K., MILLS, G.B. The cyclosporin inhibit lymphocyte activation at more than one site. J Immunol, Baltimore, v. 138, n. 4, p. 1115-1120, Feb. 1987.

27. GHIGGERI, G.M. *et al.* Cyclosporine enhances the synthesis of selected extracellular matrix proteins by renal cells "in culture". Transplantation, Baltimore, v. 57, n. 9, p. 1382-1388, May 1994.

28. GIAMBERNARDI, A.T. *et al.* Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. Matrix Biol, Stuttgart, v. 16, n. 8, p. 483-496, Mar. 1998.

29. GOLDBERG, G.I. *et al.* Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to na oncogene transformation induced rat protein. J Biol Chem, Baltimore, v. 261, n. 14, p. 6600-6605, May 1986.

30. GOLDMAN, M.H. *et al.* Ciclosporine in cardiac transplantation. Surg Clin North Am, Philadelphia, v. 65, n. 3, p. 637-659, June 1985.

31. GRANER, E. *et al.* Laminin and collagen IV distribution and ultrastructure of the basement membrane of the gingiva of the rat incisor. J Periodontal Res, Copenhagen, v. 30, n. 5, p. 349-354, Sept. 1995.

32. GRIFFITHS, G.S. *et al.* Detection of high-risk groups and individuals for periodontal disease. Clinical assessment of the periodontium. J Clin Periodontol, Copenhagen, v. 15, n. 7, p. 403-410, Aug. 1988.

33. GROSS, J., NAGAI, Y. Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. Proc Natl Acad Sci USA, Washington, v. 54, n. 4, p. 1197-1204, Oct. 1965.

34. GUIS, M.B., SLOOTWES, R.N., TONINO, G.J.M. A biochemical study of collagen in the periodontal ligament from erupting and non-erupting bovine incisors. Arch Oral Biol, Oxford, v. 18, n. 2, p. 253-263, Feb. 1973.

35. HARRIS, E.D., WELGUS, H.G., KRANE, S.M. Regulation of mammalian collagenases. Coll Relat Res, Stuttgart, v. 4, n. 6, p. 493-512, Dec. 1984.

36. HASSEL, T.M. Evidence for production of na inactive collagenase by fibroblasts from phenytoin – enlarged human gingivae. J Oral Pathol, Copenhagen, v. 11, n. 4, p. 310-317, Aug. 1982.

37. HASSEL, T.M. *et al.* Quantitative histopathologic assessment of develop phenytoin-induced gingival overgrowth in the rat. J Clin Periodontol, Copenhagen, v. 9, n. 5, p. 365-372, Sept. 1982.

38. HASTY, K.A. *et al.* Susceptibility of type I collagen containing mutated α1(1) chains to cleavage by human neutrophil collagenase. Matrix, Stuttgart, v. 13, n. 3, p. 181-186, May 1993.

39. HEMPELMANN, U. *et al.* Effect of immunosuppressive drugs on the release of metalloproteinases from human polymorphonuclear leukocytes. Transpl Int, New York, v. 4, n. 1, p. 26-30, Apr. 1991.

40. HESS, A.D., COLOMBANI, P.M. Mechanism of action of cyclosporin: hypothesis. Adv Exp Med Biol, New York, v. 213, p. 309-330, 1987.

41. JAMES, J.A., IRWIN, C.R., LINDEN, G.J. The effects of culture environment on the response of human gingival fibroblasts to cyclosporin A. J Periodontol, Chicago, v. 66, n. 5, p. 339-344, May 1995.

42. JOHNSON, L.L., DYER, R., HUPE, D.J. Matrix metalloproteinases. Curr Opin Chem Biol, Philadelphia, v. 2, n. 4, p. 466-471, Aug. 1998.

43. KAHAN, B.D. *et al.* Cyclosporine immunossupressors mitigates immunologic risk factors in renal allotransplantation. Transplant Proc, Orlando, v. 15, p. 2469-2478, 1983.

44. KAHAN, B.D. et al. Cyclosporine. N Engl J Med, Waltham, v. 321, n. 25, p. 1725-1738, Dec. 1989.

45. KANITAKIS, J., THIVOLET, J. Cyclosporine: An Immunossupressant Affecting Epithelial Cell Proliferation. Arch Dermatol, New York, v. 126, n. 3, p. 369-375, Mar. 1990.

46. KLAUSEN, B. Microbiological e immunological aspects of experimental periodontal disease in rats. A review article J Periodontol, Chicago, v. 62, n. 1, p. 59-73, Jan. 1991.

47. KIMBALL, C.D. The treatment of epilepsy with sodium diphenylhydantoinnate. JAMA, Chicago, v. 112, p. 1244-1246, 1939.

48. KITAMURA, K. *et al.* Gingival overgrowth induced by cyclosporin A in rats. Arch Oral Biol, Oxford, v. 35, n. 6, p. 483-486, 1990.

49. KRANE, S.M. Clinical importance of metalloproteinases and their inhibitors. Ann N Y Acad Sci, New York, v. 732, p. 1-10, Sept. 1994.

50. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, London, v. 227, n. 259, p. 680-685, Aug. 1970.

51. LEMAIRE, M., FAHR, A., MAURER, G. Pharmacokinetics of cyclosporine: inter- and intra-individual variations and metabolic pathways. Transplant Proc, Orlando, v. 22, n. 3, p. 1110-1112, June 1990.

52. LILLEHOJ, H.S., MALEK, R.T., SHEVACH, M.E. Diferential effects of Cyclosporin A on the expression of T and B lymphocyte activation antigens. J Immunol, Baltimore, v. 133, n. 1, p. 244-250, July 1984.

53. LISTGARTEN, M.A. Similarity of epithelial relationship in the gingiva of rat and man. J Periodontol, Chicago, v. 46, n. 11, p. 677-680, Nov. 1975.

54. LOPES, M.A. *et al.* Pulpar lesions in normal and cyclosporin a treated rats. J Endod, Baltimore, v. 23, n. 1, p. 52-53, Jan. 1997.

55. LOHI, J., KÄHARI, V.M., KESKI-OJA, J. Cyclosporin a enhances cytokine and phorbol ester – induced fibroblast collagenase expression. J Invest Dermatol, Baltimore, v. 102, n. 6, p. 938-944, June 1994.

56. MANICOURT, D.H.; LEFEBVRE, V. Na assay for Matrix Metalloproteinases and other proteases acting on proteoglycans, casein or gelatin. Annal Biochem, v. 215, n. 4, p. 171-179, April 1993.

57. MARIANI, G. *et al.* Ultrastrutural and histochemical features of the ground substance in cyclosporin A-induced gingival overgrowth. J Periodontol, Chicago, v. 67, n. 1, p. 21-27, Jan. 1996.

58. MARIOTTI, A. *et al.* Cyclosporin A and hydroxycyclosporine (M – 17) affect the secretory phenotype of human gingival fibroblasts. J Oral Pathol Med, Copenhagen, v. 27, n. 6, p. 260-266, July 1998.

59. MARTINEZ JR., I.R. The ultrastructure of the keratinizing epithelia of the incisor and molar gingivae of albino rat: similarities and differences. Anat Rec, New York, v. 170, n. 1, p. 1-29, May 1971.

60. MATRISIAN, L.M. The matrix degrading metalloproteinases. Bioessays, Cambridge, v. 14, n. 7, p. 455-463, July 1992.

61. MASSOVA, I. *et al.* Matrix metalloproteinases: structures, evolution and diversification. FASEB J, Bethesda, v. 12, n. 12, p.1075-1095, Sept. 1998.

62. MCGAW, W.T., PORTER, H., EDMONTON, B.S. Cyclosporine-induced gingival overgrowth: an ultrastructural stereologic study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, Saint Louis, v. 65, n. 2, p. 186-190, Feb. 1988.

63. MODÉER, T. *et al.* Interleukin-1 phenytoin reduce (I) procollagen mRNA expression in human gingival fibroblasts. J Periodontal Res, Copenhagen, v. 31, n. 8, p. 563-568, Nov. 1996.

64. MORISAKI, I. *et al.* Positive correlation beTween blood cyclosporin A level and severity of gingival overgrowth in rats. J Periodontol, Chicago, v. 68, n. 1, p. 7-11, Jan. 1997.

65. MURPHY, G. *et al.* Stromelysin is na activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. Biochem J, London, v. 248, n. 1, p. 265-268, Nov. 1987.

66. _____. *et al.* Regulation of Matrix Metalloproteinase Activity. Ann N Y Acad Sci, New York, v. 732, p. 31-41, Sept. 1994

67. MYRILLAS, T.T. *et al.* Cyclosporin A regulates interleukin-1b and interleukin-6 expression in gingiva: implications for gingival overgrowth. J Periodontol, Chicago, v. 70, n. 3, p. 294-300, Mar. 1999.

68. NABEL, G.J. A transformed view of cyclosporine. Nature, London, v. 397, n. 6719, p. 471-472, Feb. 1999.

69. NAGASE, H. *et al.* Substrate epecifities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. Biochem Soc Trans, London, v. 19, n. 3, p. 715-718, Aug. 1991.

70. _____.., WOESSER JR., J.F. Matrix Metalloproteinases. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem, Baltimore, v. 274, n. 31, p. 21491-21494, July 1999.

71. NELL, A. *et al.* Evidence that cyclosporine inhibits periodontal prostaglandin E2 synthesis. J Periodontal Res, Copenhagen, v. 31, n. 2, p. 131-134, Feb. 1996.

72. NEWELL, J., IRWIN, C.R. Comparative effects of cyclosporin on glycosaminoglycan synthesis by gingival fibroblasts. J Periodontol, Chicago, v. 68, n. 5, p. 443-447, May 1997.

73. NIIMI, A. *et al.* Immunohistochemical analysis of effects of cyclosporin a on gingival epithelium. J Oral Pathol Med, Copenhagen, v. 19, n. 9, p. 397-403, Oct. 1990.

74. NISHIKAWA, S. et al. Nifedipine - induced gingival hyperplasia: A clinical and in vitro study*. J Periodontol, Chicago, v. 62, n. 1, p. 30-35, Jan. 1991.

75. . _____ *et al.* Patogenesis of drug-induced gingival overgrowth. A review of studies in the rat model. J Periodontol, Chicago, v. 67, n. 5, p. 463-471, May 1996.

76. OGATA, Y., ENGHILD, J.J., NAGASE, H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. J Biol Chem, Baltimore, v. 267, n. 6, p. 3581-3584, Feb. 1992.

77. OLSEN, B.R. New insights into the function of collagens from genetic analysis. Curr. Opin. Cell. Biol., v.7, p. 720-727, 1995.

78. ONO, M. *et al.* Effects of cyclosporin A on cell proliferation and collagen production by human skin fibroblasts. J Dermatol Sci, Limerick, v. 2, n. 4, p. 274-280, July 1991.

79. OTA, B., BRADLEY, M. Side effects of cyclosporine in 100 renal allograft recipients. Transplant Proc, Orlando, v. 15, p. 3150-3156, 1983. *Apud* LOPES, M.A. Desenvolvimento de lesões pulpares e periapicais em ratos normais e imunossuprimidos. Piracicaba, 1993. 99p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

80. O'VALLE, F. *et al.* Immunohistochemical study of 30 cases of cyclosporin a-induced gingival overgrowth. J Periodontol, Chicago, v. 65, n. 7, p. 724-730, July 1994.

81. PAGE, C., SCHOROEDER, H.E. Periodontites in man and other animals : a comparative review. Basel : Karger, 1982. p. 71-106.

82. PARSONS, S.L. *et al.* Matrix metalloproteinases. Br J Surg, Surrey, v. 84, n. 2, p. 160-166, Feb. 1997.

83. PISANTY, S. *et al.* Prolonged systemic administration of cyclosporin a affects gingival epithelium. J Periodontol, Chicago, v. 61, n. 2, p. 138-141, Feb. 1990.

84. PIHLSTROM, B.L. Prevention and treatment of dilantin-associated gingival enlargament. Compendium, Detroit, v. 14, p. 506-510, Mar. 1990. [Supplement, 14]

85. PHILLIPS, R.P., BORRELLO, M.A., BLIEDEN, T.M. Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. J Periodontal Res, v. 32, n. 1 pt. 2, p. 159-165 Jan. 1997.

86. RATEITSCHAK-PLÜSS, E.M. *et al.* Initial observation that cyclosporin-A induces gingival elargement in man. J Clin Periodontol, Copenhagen, v. 10, n. 3, p. 237-246, May 1983.

87. ROSS, P.J. *et al.* Effects of cyclosporin A on gingival status following liver transplantation. ASDC J Dent Child, Chicago, v. 56, n. 1, p. 56-59, Jan./Feb. 1989.

88. SALO, T., OIKARINEN, K.S., OIKARINEN, A.I. Effect of phenytoin and nifedipine on collagen gene expression in human gingival fibroblasts. J Oral Pathol Med, Copenhagen, v. 19, n. 9, p. 404-407, Oct. 1990.

89. SATOH, T. Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. Mol Cell Biol, Washington, v. 8, n. 8, p. 3546-3549, Aug. 1988.

90. SCHELLENS, J.P.M., EVERTS, V., BEERTSEN, W. Resorption of connective tissue in the gingiva of the mouse incisor. Anat Rec, New York, v. 195, n. 1, p. 95-108, Sept. 1979.

91. _____., _____., _____. Quantitative analysis of connective tissue resorption in the supra-alveolar region of the mouse incisor ligament. J Periodontal Res, Copenhagen, v. 17, n. 4, p. 407-422, July 1982.

92. SCHINCAGLIA, G.P. *et al.* Cyclosporin-A increases type I procollagen production and mRNA level in human gingival fibroblasts "in vitro". J Oral Pathol Med, Copenhagen, v. 21, n. 4, p. 181-185, Apr. 1992.

93. SCHREIBER, S.L. Chemistry e biology of the immunophilins and theia immunosuppressive ligands. Science, Washington, v. 251, n. 4991, p. 283-287, Jan. 1991.

94. SEYMOUR, R.A., SMITH, D.G. The effect of a plaque control programme on the incidence and severity of cyclosporin-induced gingival changes. J Clin Periodontol, Copenhagen, v. 18, n. 2, p. 107-110, Feb. 1991.

95. _____., JACOBS, D.J. Cyclosporin and the gingival tissues. J Clin Periodontol, Copenhagen, v. 19, n. 1, p. 1-11, Jan. 1992.

96. SOMACARRERA, M.L. *et al.* Localization of gingival overgrowth in heart transplant patients undergoing cyclosporin therapy. J Periodontol, Chicago, v. 65, n. 7, p. 666-670, July 1994.

97. _____. *et al.* Factors related to the incidence and severity of ciclosporin-induced gingival overgrowth in transplant patients. A longitudinal study. J Periodontol, Chicago, v. 65, n. 7, p. 671-675, July 1994.

98. SORSA, T. et al. Effects of tetracyclines on neutrophil, gingival and salivary collagenases. The N. Y. Academy of Sciences, p. 112-131, 1994.

99. SOUZA, S.J. *et al.* Regulation of extracelular matrix degrading proteases. Ciênc Cult, São Paulo, v. 45, p. 313-318, 1994.

100 _____., BRENTANI, R.R. Collagen-binding site in collagenases can be determined using the concept of sense/antisense peptide interactions. J Biol Chem, Baltimore, v. 267, n. 19, p. 13763-13767, July 1992.

101 SPOLIDÓRIO, L.C. Aspectos morfométricos e estereométricos do aumento gengival induzido pela ciclosporina. Piracicaba, 1996. 169p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

102 STARZL, T.E. et al. The use of cyclosporin A and predisone in cadaver kidney transplantation. Surgery Gynecology & Obstetrics, v.151, p. 17-26, 1985.

103 STEINMULLER, G. Cyclosporin and organ transplantation. Cleve Clin Q, Cleveland, v. 52, n. 2, p. 263-270, Summer 1985.

104 SUGANO, N., ITO, K., MURAI, S. Cyclosporin a inhibits collagenase gene expression via AP-1 and JNK supression in human gingival fibroblasts. J Periodontal Res, Copenhagen, v. 33, n. 8, p. 448-452, Nov. 1998.

105 TEN CATE, A.R. Physiologival resorption of connective tissue associated with tooth eruption. An electron microscopic study. J Periodontal Res, Copenhagen, v. 6, n. 3, p. 168-181, 1971.

106 TEN CATE, A.R. Oral histology : development, structure and function. 3rd ed. Toronto : Mosby, 1989.

107 THOMASON, J.M., PHILIP, S., SEYMOUR, A.R. Immunolocalization of collagenase (MMP-1) and stromelysin (MMP-3) in the gingival tissues of organ transplant patients medicated with cyclosporin. J Clin Periodontol, Copenhagen, v. 25, n. 7, p. 554-560, July 1998.

108 TIPTON, D.A., STRICKLIN, G.P., DABLOUS, M.K. Fibroblast heterogenicity in collagenolytic response to cyclosporine. J Cell Biochem, New York, v. 46, n. 2, p. 152-165, June 1991.

109 TOWPIK, E., KUPIEC-WEGLINSKI, J.W., TILNEY, N.L. The potencial use of cyclosporine in reconstructive surgery. Plast Reconstr Surg, Baltimore, v. 76, n. 2, p. 312-322, Aug. 1985.

110 UNEMORI, E.N. et al. Stromelysin expression regulates collagenase activation in human fibroblasts. Dissociable control of two metalloproteinases by interferon-gamma. J Biol Chem, Baltimore, v. 266, n. 34, p. 23477-23482, Dec. 1991.

111 VOLPE, A. *et al.* Hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina estudo clínico e histopatológico. RPG, São Paulo, v. 4, p. 133-140, 1997.

112 ZEBROWSKI, E.J. *et al.* Comparative metabolism of 3H – glucosamine by fibroblast populations exposed to cyclosporine. J Periodontol, Chicago, v. 65, n. 6, p. 565-567, June 1994.

113 WASSEF, R., COHEN, Z., LANGER, B. Pharmakocinetic profiles of cyclosporine in rats. Influence of rante of administration and dosage. Transplantation, Baltimore, v. 40, n. 5, p. 489-493, Nov. 1985.

114 WENGER, R.M. Structures of cyclosporine and its metabolites. Transplant Proc, Orlando, v. 22, n. 3, p. 1104-1108, June 1990.

115 WILLERSHAUSEN-ZONNCHEN, B., LEMMEN, C., SCHUMACHER, U. Influence of cyclosporine a on growth and extracellular matrix synthesis of human fibroblast. J Cell Physiol, Philadelphia, v. 152, n. 2, p. 397-402, Aug. 1992.

116 WILLIAMSON, M.S. *et al.* Cyclosporine a upregulates interleukin-6 gene expression in human gingiva: possible mechanism for gingival overgrowth. J Periodontol, Chicago, v. 65, n. 10, p. 895-903, Oct. 1994.

117 WISKOTT, E. Sandimmun - The prototype of a new generation of immunossupressive agents. Int Sandoz Gaz, v. 45, 1983. *Apud* ARAÚJO, E.B.S. Análise radiográfica e histológica da evolução de lesões periapicais em cães normais e imunossuprimidos. Piracicaba, 1998. 93p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

118 WOESSNER, J.F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB J, Bethesda, v. 5, n. 8, p. 2145-2154, May 1991.

119 WOESSNER, J.F. The family of matrix metalloproteinases. Ann N Y Acad Scien, New York, v. 732, p. 11-21, Sept. 1994.

120 WONDIMU, B., MODÉER, T. Cyclosporin A upregulates prostaglandin E 2 production in human gingival fibroblasts challenged with tumor necrosis factor alpha "in vitro". J Oral Pathol Med, Copenhagen, v. 26, n. 1, p. 11-16, Jan. 1997.

121 WYSOCKI, G.P. *et al.* Fibrous hyperplasia of the gingiva: a side effect of cyclosporin a therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, Saint Louis, v. 55, n. 3, p. 274-278, Mar. 1983.

122 WYSOCKI, G.P., DALEY, T.P. Hypertrichosis in patients receiving cyclosporine terapy. Clin Exp Dermatol, Oxford, v. 12, n. 3, p. 191-196, May 1987.