NELSON GNOATTO

**EXPRESSÃO DE PROTEOHEPARANS SULFATO
DE SUPERFÍCIE CELULAR NO CRESCIMENTO GENGIVAL
INDUZIDO PELA CICLOSPORINA-A EM HUMANOS**

São Paulo

2006

Nelson Gnoatto

**Expressão de proteoglicanos sulfato
de superfície celular no crescimento gengival
induzido pela ciclosporina-A em humanos**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São Paulo,
para obter o título de Doutor, pelo Programa
de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Fraga Moreira
Lotufo

Co-orientadora: Profa. Dra. Mônica Valeria
Marquezini

São Paulo

2006

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gnoatto N. Expressão de proteoglicanos sulfato de superfície celular no crescimento gengival induzido pela ciclosporina-A em humanos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

São Paulo, 27/03/2006

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Auxílio à Pesquisa FAPESP (processo nº 01/00392-9).

DEDICATÓRIA

*A meus pais, **Zulema** e **Dante**, que sempre primaram pela minha plena felicidade.*

*A meus irmãos, **Daniel** e **Cecília**, fontes incondicionais de amor e generosidade.*

Aos pacientes portadores e candidatos a transplantes de órgãos, cujo dia-a-dia expressa a verdadeira busca pela vida em harmonia. Com eles tive grandes lições de vida.

Ao meu orientador e amigo **Roberto Lotufo**, que desde cedo deu razão e impulso à minha vida acadêmica e científica. Leal e conciliador, sempre residirá em meus melhores pensamentos.

À minha co-orientadora e amiga **Mônica Marquezini**, que nos dedicou toda sua força e conhecimento para que este trabalho fosse bem realizado. Abriu-nos o caminho da pesquisa, que nos parecia árido, e veio a tornar-se um delicioso desafio sem o qual não podemos mais viver.

Ao Prof. Titular **Francisco Emílio Pustiglioni**,

Ao Prof. Associado **Cesário A. Duarte**,

Ao Prof. Associado **Luís Antônio P. Alves de Lima**,

Ao Prof. Associado **Giorgio De Micheli**,

Ao Prof. Dr. **Koto Nakae**,

Ao Prof. Dr. **Marco Antônio P. Georgetti**,

À Profa. Dra. **Sílvia Rosana Soares Carneiro**,

Ao Prof. Dr. **Giuseppe Alexandre Romito**,

Ao Prof. Dr. **Cláudio Mendes Pannuti**,

Ao Prof. Dr. **José Hildebrando Todescan**,

Ao Prof. Dr. **José Cássio Marques Carvalho** (*in memoriam*),

Ao Prof. Dr. **Simão Kon** (*in memoriam*),

Representaram muito em minha
formação e tornaram-se grandes companheiros nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

À minha amiga **Monique Matsuda**, parceira nesta prazerosa rotina de investigação, a quem devo todo meu carinho e respeito. Sem seu espírito de equipe e cooperação constantes, este trabalho não teria sido tão gratificante.

Aos colegas **Daniel Siquieroli Vilas Boas** e **Vanessa Penna**, que muito nos auxiliaram com sua dedicação incondicional em todos os momentos deste trabalho.

À Dra. **Célia M. C. Strunz**, diretora do Laboratório Clínico do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina - USP, que disponibilizou toda a estrutura para a realização de nossos experimentos.

À Profa. Dra. **Aldina Barral** e ao Prof. Dr. **Manoel Barral Netto**, do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ - Salvador-BA, e a toda sua equipe, pela importante cooperação nos estudos de imunohistoquímica deste trabalho. À Profa. Dra. **Maria Jânia Teixeira**, pelos ensinamentos e o companheirismo dedicados nesta importante etapa.

À Profa. Dra. **Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa**, à Profa. Dra. **Andréa Mantesso** e a toda a equipe da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP,

pela colaboração plena de parceria e profissionalismo A **Edna Toddai** e **Elisa dos Santos**, pela disponibilidade e simpatia manifestadas ao longo de todo o estudo.

Ao Prof. Dr. **Giorgio De Micheli**, coordenador do Curso de Especialização em Periodontia da Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Odontologia - FOUSP, e seus assistentes e alunos, que contribuíram em nossa casuística.

À Profa. Dra. **Odaly Toffoletto**, coordenadora da Unidade de Farmacologia Clínica do Hospital do Rim e Hipertensão - Fundação Oswaldo Ramos, pela atenção constante em todos os momentos em que precisamos de auxílio.

Ao Prof. Dr. **Sami Arap**, Professor Titular da Disciplina de Urologia da Faculdade de Medicina - USP, e sua equipe, pela importante cooperação clínica.

À Dra. **Eliane F. G. Prado** e à equipe da **Divisão de Odontologia** do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina - USP, que colaboraram na etapa clínica deste trabalho.

Ao meu amigo Prof. **Manoel Medeiros Neto**, que tenho por modelo de generosidade e sabedoria. Sempre me amparou e impulsionou.

Ao Prof. **Urbino da Rocha Tunes** e aos colegas da Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências, com quem venho trabalhando numa prazerosa parceria e com quem espero produzir muitos outros frutos.

Ao Prof. Dr. **Sérgio Luiz Salvador**, ao Prof. Dr. **Paulo Tambasco de Oliveira**, à Profa. Dra. **Márcia Martins Marques** e à Prof. Dra. **Cristiane Miranda França Padrón**, importantes aliados e incentivadores desta caminhada.

Aos amigos periodontistas **Cássio V. Carvalho**, **Dacio Pantano Jr.**, **Luciana Saraiva**, **Maria Aparecida Campoli**, **Marina Conde**, **Ana Cristina Solis**, **Ilíria Feist** e a todos os pós-graduandos da **Periodontia da FOU SP**. Juntos vivenciamos nossas revoluções pessoais e encontramos o sentido do companheirismo e da cooperação. Muita saudade de quando vivíamos juntos.

A **Vera Lúcia S. C. Almeida**, **Márcia Santos** e **Mara Hort**, secretárias do Departamento de Estomatologia, que muito auxiliaram em toda minha pós-graduação. Às bibliotecárias **Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro** e **Glauci Elaine Damasio Fidelis**, pela verificação e normalização desta tese.

Aos amigos **Fabian Diniz**, **Daniela Palioto**, **Maria Ângela** e **Pedro Rosateli**, **Regina** e **Rogério Kaneko**, **Danilo** e **Viviane Ribeiro** e a todos que me incentivaram em mais esta etapa.

À **FAPESP**, pelo auxílio à pesquisa concedido.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a conclusão deste trabalho.

Gnoatto N. Expressão de proteoglicanos sulfato de superfície celular no crescimento gengival induzido pela ciclosporina-A em humanos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

O crescimento gengival induzido por ciclosporina-A (CG) é caracterizado por uma variedade de sinalizações que envolvem fatores de crescimento e proteoglicanos, porém pouco compreendidas. Investigamos a expressão gênica dos proteoglicanos sulfato de superfície celular sindecam-2 (SDC-2), -4 (SDC-4) e betaglicam nesse CG. A quantidade total e relativa de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) e a distribuição de SDC-2 e SDC-4 no tecido gengival também foram analisadas. Métodos: A expressão de mRNA dos proteoglicanos SDC-2, SDC-4 e betaglicam foi analisada pela reação de polimerase em cadeia e transcrição reversa (RT-PCR) em amostras gengivais de 9 indivíduos com CG (grupo CsA) e 6 com gengiva normal (grupo controle). Os GAGs foram extraídos e purificados dos tecidos gengivais e analisados tanto por eletroforese em gel de agarose quanto por espectrofotometria. Foi realizada uma avaliação imunohistoquímica dos tecidos com anticorpos para SDC-2 e SDC-4, para sua localização nos tecidos. Os grupos foram comparados pelo teste *t* de Student. Resultados: Todos os proteoglicanos estudados mostraram-se aumentados no grupo CsA (165% para SDC-2, 308% para SDC-4 e 42% para betaglicam), comparativamente ao grupo controle ($P < 0.0001$). Não foram observadas diferenças significativas na quantidade total e relativa de GAGs. A imunohistoquímica mostrou uma distribuição marcante de SDC-2 e SDC-4 no componentes epitelial, conjuntivo, vascular, nervoso e inflamatório, incluindo os compartimentos celulares e matriciais de toda a casuística. Nossos resultados revelam expressão aumentada de mRNA de SDC-2, SDC-4 e betaglicam no crescimento gengival induzido pela ciclosporina-A, porém não se observaram diferenças na quantidade de glicosaminoglicanos sulfatados em relação ao tecido gengival não exposto ao fármaco.

Palavras-Chave: Crescimento gengival – Ciclosporina-A – Matriz extracelular – Proteoglicanos – Glicosaminoglicanos – Sindecam – Betaglicam

Gnoatto N. Expression of cell-surface heparan sulfate proteoglycans in human cyclosporin-induced gingival overgrowth [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

Cyclosporin-induced gingival overgrowth (CIGO) comprises a variety of signaling pathways including growth factors and proteoglycans that remains not fully understood. We investigated the gene expression of the cell-surface heparan sulfate proteoglycans syndecan-2 (SDC-2), -4 (SDC-4) and betaglycan in CIGO. Total and relative amounts of sulfated glycosaminoglycans (GAGs) and the distribution of SDC-2 and SDC-4 in the gingival tissue were also analyzed. Methods: mRNA expression of the proteoglycans SDC-2, -4 and betaglycan was analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in gingival samples obtained from 9 individuals with CIGO and 6 with a normal gingiva (control group). GAGs were extracted and purified from gingival tissues and analyzed by agarose gel electrophoresis and spectrophotometry. An immunohistochemical evaluation using panels of antibodies for SDC-2 and -4 was performed for localization in the tissues. Groups were compared by the Student's *t* test. Results: All proteoglycans expressions revealed increase in the CIGO group (165% for SDC-2, 308% for SDC-4 and 42% for betaglycan) compared to the control group ($P < 0.0001$). No significant differences were observed for the total and relative amounts of GAGs. Immunohistochemistry showed a marked distribution of SDC-2 and SDC-4 in gingival epithelial, connective, vascular, neural and inflammatory components comprising cellular and matrix environments in both groups. Our results reveal increased mRNA expression of SDC-2, SDC-4 and betaglycan in CIGO, but no significant differences in the sulfated glycosaminoglycans component *in situ*.

Keywords: Gingival overgrowth – Cyclosporin-A – Extracellular matrix – Proteoglycans – Glycosaminoglycans – Syndecan – Betaglycan

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bFGF	fator de crescimento básico de fibroblasto
CD4	linfócito T auxiliar/indutor
CD44	co-receptor de superfície celular do ácido hialurônico
CD8	linfócito T citotóxico/supressor
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CG	crescimento gengival
CS	condroitin sulfato
CsA	ciclosporina-A
Ctr	controle
DNA	ácido desoxirribonucléico
DS	dermatan sulfato
EGF	fator de crescimento de epiderme
ELISA	ensaio imunoenzimático (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FGFR1	receptor de fator de crescimento básico de fibroblasto
GAG	glicosaminoglicano

HS	heparan sulfato
IFN- γ	interferon-gama
IL	interleucina
KGF	fator de crescimento de queratinócito
MEC	matriz extracelular
MMP	metaloproteinase de matriz
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
pb	pares de bases
PDGF-B	fator de crescimento derivado de plaquetas-B
PG	proteoglicano
PGHS	proteoheparan sulfato
PMN	polimorfonuclear neutrófilo
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	transcrição reversa acoplada à reação de polimerase em cadeia
SDC	sindecam
SF	fator de crescimento de hepatócitos (<i>scatter factor</i>)
TGF- β	fator de crescimento transformador-beta
Th-2	linfócito T auxiliar-2
TIMP	inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3 PROPOSIÇÃO	49
4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1 Casuística.....	50
4.2 Métodos	55
5 RESULTADOS	66
6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS	97
ANEXO.....	103

1 INTRODUÇÃO

O crescimento gengival (CG) pode ser um dos efeitos colaterais associados ao uso sistêmico do imunossupressor ciclosporina-A (CsA), extensamente utilizado por pacientes transplantados na prevenção da rejeição do enxerto (ÇALNE et al., 1979; RATEITSCHAK-PLÜSS et al., 1983), bem como no tratamento de doenças de fundo imunológico (POWLES et al., 1980). Efeito colateral semelhante pode ser observado quando do uso prolongado de outras categorias de fármacos, como os anticonvulsivantes fenitoína (KIMBALL, 1939) e valproato de sódio (SYRJANEN; SYRJANEN, 1979) e os bloqueadores de canais de cálcio nifedipina (RAMON et al., 1984; LEDERMAN et al., 1984), verapamil (COLVARD et al., 1986) e diltiazem (GIUSTINIANI; CUNA ROBUSTELLI; MARIENI, 1987). Apesar das distintas propriedades farmacodinâmicas destes medicamentos, os crescimentos gengivais por eles produzidos têm sido abordados como entidades similares em seu aspecto clínico e histológico, e uma hipótese unificadora de etiopatogenia já foi proposta por alguns autores (LUCAS; HOWELL; WALL, 1996; SEYMOUR; THOMASON; ELLIS, 1996). A validade desta extrapolação representa uma importante questão, que deverá ter resposta à medida que evoluírem os estudos da patogênese das alterações gengivais como um todo.

Muitas questões permanecem incompreendidas no perfil descritivo de todos os crescimentos gengivais induzidos por fármacos. A principal questão é a ação do

fármaco sobre as células, uma vez que está inserida em uma resposta tecidual multifatorial, onde merece destaque a inflamação induzida pela placa bacteriana.

A patogênese do CG induzido pela CsA está pouco esclarecida e tem interpretações ainda controvertidas entre seus investigadores. A alteração gengival é, aparentemente, produzida por um acúmulo de matriz extracelular, caracterizado por deficiência na degradação do colágeno (THOMASON; SLOAN; SEYMOUR, 1998), já comprovada também no aspecto de sua expressão gênica (HYLAND et al., 2004; YAMADA et al., 2000).

A expressão de moléculas sinalizadoras analisada *in vitro* corrobora com o paradigma mais aceito da estimulação e crescimento da matriz. Foi constatado um aumento nos níveis das citocinas IL-6 (MORTON; DONGARI-BAGTZOGLOU, 1999; WILLIAMSON et al., 1994;) e IL-1 β (MYRILLAS et al., 1999) e dos fatores de crescimento fibrogênicos PDGF-B (NARES et al., 1996) e TGF- β (JAMES; IRWIN; LINDEN, 1998), além dos fatores proliferativos KGF DAS; PARKAR; OLSEN, 2001) e bFGF (YOSHIDA; NAGATA; YAMANE, 2005). Quando analisados os níveis no fluido sulcular gengival, no entanto, não se observaram diferenças de TGF- β em indivíduos com CG induzido por CsA em relação à gengiva normal (BUDUNELI et al., 2001), e sim um aumento de IL-15 (BUDUNELI et al., 2003).

Além da deficiente atividade collagenolítica, destaca-se no CG induzido pela CsA um aumento na síntese de componentes não colagênicos da matriz, com destaque para os proteoglicanos e glicosaminoglicanos (MARIOTTI et al., 1998; NEWELL; IRWIN, 1997). Uma maior expressão do proteoglicano perlecan, predominante nas membranas basais, foi constatada em nosso estudo anterior (GNOATTO et al., 2003). O perlecan

pertence à família dos proteoheparans sulfato (PGHSs), que têm grande afinidade por fatores de crescimento, em especial o bFGF. Estes proteoglicanos retêm o fator de crescimento no tecido e regulam sua biodisponibilidade. Importantes sinalizações proliferativas estão envolvidas, entre elas a regulação da neoangiogênese (WHITELOCK et al., 1996).

Assim como o perlecan, a família dos sindecans e o betaglican são PGHSs importantes nas interações célula-célula e célula-matriz, e desencadeiam vias sinalizadoras que também estimulam o crescimento e a angiogênese, entre outros fenômenos biológicos. Estes PGHSs nunca foram estudados no CG induzido pela CsA e estão associados a fatores de crescimento aparentemente aumentados nessa alteração gengival. Estas informações levaram-nos a investigar a expressão dos SDCs e do betaglican no tecido gengival humano alterado pela CsA.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O primeiro relato de CG induzido por um fármaco data de 1939, por Kimball, associado ao uso prolongado do anticonvulsivante fenitoína. Publicações posteriores relataram a mesma alteração induzida pelo imunossupressor CsA (CALNE et al., 1979), pelo anticonvulsivante valproato de sódio, em casos isolados (SYRJANEN; SYRJANEN, 1979), e pelos antagonistas de cálcio nifedipina (LEDERMAN et al., 1984; RAMON et al., 1984), verapamil (COLVARD et al., 1986) e diltiazem (GIUSTINIANI; CUNA ROBUSTELLI; MARIENI, 1987).

Todas essas alterações gengivais possuem características clínicas e histológicas similares (TYLDESLEY; ROTTER, 1984; WYSOCKI et al., 1983), residindo algumas diferenças nos relatos de prevalência nas várias populações analisadas. Por outro lado, os estudos *in vitro* da biologia celular e molecular dessas lesões abrem questionamentos quanto à sua similaridade e representam apenas o início da investigação de sua etiopatogenia.

2.1 O crescimento gengival induzido pela CsA

A CsA é um metabólito fúngico com potentes propriedades imunossupressoras, utilizado rotineiramente há cerca de três décadas para prevenir a rejeição de órgãos

transplantados (CALNE et al., 1979). É também utilizada no tratamento de doenças auto-imunes ou com base imunológica (POWLES et al., 1980).

O mecanismo de ação da CsA na imunossupressão ocorre por uma inibição da resposta imune celular, mediada principalmente pela interferência na ativação de linfócitos T. Entre os principais mecanismos envolvidos, a CsA inibe a via de transdução de sinais nos receptores destas células por meio de sua ligação à ciclofilina, inibindo assim a calcineurina (fosfatase protéica 2B), participante da ativação de genes para a produção de linfocinas, tais como IL-2, IL-1 β e IL-6, TNF- α , entre outras moléculas (DAWSON; HURTENBACH; MACKENZIE, 1996; EMMEL et al., 1989; FLANAGAN et al., 1991).

O CG induzido pela CsA ocorre com grande variabilidade entre as populações. Seus valores de prevalência publicados variam entre 8% e 85% dos indivíduos expostos à medicação, na dependência de sua dosagem. Dentro dessa heterogeneidade, pode-se constatar que a maioria das populações exibe prevalência de CG entre 30% e 50% (PERNU et al., 1993; TYLDESLEY; ROTTER, 1984). No Brasil, Romito et al. (2004) analisaram 30 pacientes transplantados cardíacos e verificaram prevalência de CG em 67% dos usuários de CsA. Saraiva (2000) realizou um estudo longitudinal e constatou incidência de CG em 56% dos indivíduos transplantados renais analisados, dentro do primeiro trimestre de uso de CsA.

A prevalência e a severidade do CG induzido por CsA são consideravelmente aumentadas em pacientes que fazem uso simultâneo de fenitoína (0% a 84,5%, média de 50%) ou de determinados antagonistas de cálcio, como a nifedipina (15% a 83%, média de 42,5%), bem como em crianças e adolescentes (DALEY; WYSOCKI; DAY,

1986; PERNU et al., 1993; SLAVIN; TAYLOR, 1987; THOMASON et al., 1995). No Brasil, David-Neto et al. (2000) analisaram 46 crianças e adolescentes transplantados renais e constataram prevalência de CG de 76% nos pacientes que usavam CsA e de 100% naqueles que faziam uso associado de nifedipina.

O crescimento do tecido gengival se manifesta dentro do primeiro trimestre de tratamento com CsA (SEYMOUR; SMITH; ROGERS, 1987; TYLDESLEY; ROTTER, 1984), podendo seguir padrões variáveis entre indivíduos. Sua evolução geralmente atinge um estado de equilíbrio ainda no primeiro ano de uso continuado do medicamento, podendo ser alterado por mudanças no esquema terapêutico ou nas condições de saúde geral do paciente (SEYMOUR; THOMASON; ELLIS, 1996).

A alteração clínica do tecido gengival inicia-se por um crescimento nodular e lobulado das papilas interdentárias, mais pronunciado em sua porção vestibular. Esse crescimento evolui estendendo-se ao longo da gengiva marginal às faces livres dos dentes. Existe uma predileção pela gengiva do segmento anterior da arcada dentária. Em casos mais severos, pode ocorrer o recobrimento parcial da porção incisal ou da face oclusal dos dentes pelo tecido gengival aumentado, ocasionando interferências na função mastigatória, na deglutição e na fala (SEYMOUR; JACOBS, 1992).

O tecido gengival aumentado mostra-se clinicamente firme e denso na maioria dos casos, podendo no entanto perder esta característica quando alterado por edema e hiperemia produzidos por inflamação decorrente do acúmulo de placa bacteriana (TYLDESLEY; ROTTER, 1984).

2.2 Características histológicas

A maioria dos investigadores tem atribuído ao CG induzido por CsA um predomínio de alterações no tecido conjuntivo e dada importância secundária ao epitélio. O epitélio gengival - do tipo pavimentoso estratificado e predominantemente paraqueratinizado - apresenta, nestes crescimentos gengivais, acantose e aumento na extensão das projeções digitiformes e da membrana basal na interface com o tecido conjuntivo aumentado (PISANTY et al., 1990; TYLDESLEY; ROTTER, 1984).

A acantose do epitélio é descrita na literatura com certa variabilidade, entretanto poucos estudos a analisaram em profundidade, principalmente no aspecto molecular. Niimi et al. (1990), em análise imunohistoquímica da expressão de DNA polimerase- α no CG induzido por CsA, sugeriram que o aumento do epitélio é devido a uma diminuição na senescência dos queratinócitos, e não a uma hiperplasia.

Recentemente, o estudo de sinalizadores desse crescimento epitelial trouxe novos indícios. Em análise do fator de crescimento de queratinócitos (KGF), Das, Parkar e Olsen (2001) fizeram sua imuno-localização na gengiva humana e verificaram positividade no tecido afetado pela CsA e negatividade nos controles normais. Hyland et al. (2004), utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) para KGF e SF (*scatter factor* ou fator de crescimento de hepatócitos), ambos associados ao crescimento epitelial, identificaram sua expressão aumentada no grupo CsA. Yamaguchi et al. (2004) analisaram a expressão mRNA da enzima lisossomal N-acetyl- β -D-glicosaminidase,

envolvida na remodelação do epitélio gengival, não constatando alterações induzidas pela CsA.

Mariani et al. (2004) sugerem uma participação importante do epitélio no CG produzido pela CsA, com base em análise imunohistoquímica e de microscopia eletrônica de varredura das amostras gengivais de 18 pacientes transplantados de fígado. Verificaram também, entre seus achados, hiperkeratose e ausência dos grânulos de Birbeck específicos das células de Langerhans. O mesmo grupo de investigadores já havia descrito o tecido conjuntivo como sendo caracterizado por uma lâmina própria aumentada no componente vascular, abundante matriz extracelular (MEC) típica dos tecidos conjuntivos densos, expansão dos componentes colagênico e não colagênico, e marcante infiltrado de plasmócitos, linfócitos e macrófagos (MARIANI et al., 1996). Também chegaram a relacionar a imensa população de plasmócitos (morfologicamente normais e em diferentes estágios de maturação) à hipótese de uma provável hipersensibilidade à CsA, pelo fato da interrupção da medicação ser suficiente para reverter o quadro de resposta celular (MARIANI et al., 1993). Esta hipótese havia sido proposta anteriormente por Lambertenghi-Deliliers et al. (1986).

Acredita-se que o componente plasmocitário aumentado nesse CG esteja associado a um provável mecanismo de ativação dependente de linfócitos Th-2 (BERGLUNDH; LINDHE; TARKOWSKI, 1996), paralelamente ao aumento de linfócitos T auxiliares/indutores (CD4) e citotóxicos/supressores (CD8), bem como na relação CD4/CD8 (O'VALLE et al., 1994).

Yamasaki et al. (1987) observaram que os fibroblastos do tecido gengival aumentado pela CsA tinham intensa síntese e secreção protéicas e insignificante alteração citotóxica ou degenerativa, sendo que uma proporção (24%) dessas células

exibia modificações características de miofibroblastos, encontrados em algumas doenças fibróticas e neoplásicas. O número de fibroblastos, no entanto, não parecia estar alterado, como foi também constatado por Rostock, Fry e Turner (1986) e McGaw e Porter (1988).

Schincaglia et al. (1992) observaram inalteração na proporção de fibroblastos no CG, porém seus achados imunohistoquímicos mostraram maior quantidade de colágeno tipo IV, que relacionaram à maior proporção de membranas basais subepiteliais e perivasculares.

O componente vascular expandido foi descrito por Bonnaure-Mallet, Tricot-Doleux e Godeau (1995) e Wondimu, Reinholt e Modéer (1995), associado a grande quantidade de MEC não colagênica.

Mariani et al (1996), utilizando métodos de microscopia eletrônica de transmissão e histoquímica, descreveram uma maior proporção no componente de glicosaminoglicanos em biópsias de CG induzido por CsA, comparativamente à gengiva normal. Estes autores atribuíram que a característica edematosa do tecido foi produzida principalmente pelo aumento desses glicosaminoglicanos, capazes de promover retenção hídrica anormal nesse tecido.

2.3 Patogênese

Apesar da relação entre o uso da CsA e o crescimento gengival ser reconhecida há mais de duas décadas, a patogênese desse crescimento ainda não está bem

estabelecida. Acredita-se na interação fármaco-fibroblasto (MARIANI et al., 1996; THOMASON; SLOAN; SEYMOUR, 1998), uma vez que as três classes de fármacos que induzem CG atuam inibindo a entrada de cálcio nas células (GELFAND; CHEUNG; MILLS, 1987). Isto pode justificar parte das ações da CsA na patogênese da alteração gengival, visto que fenômenos de síntese de metaloproteinases de matriz (MMPs), ativação e proliferação celular e liberação de citocinas são dependentes de cálcio (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; SCHMIDT et al., 1982).

Uma série de fatores vem sendo correlacionada na interação fármaco-fibroblasto. Entre os fatores mais estudados, destacamos a predisposição genética, as variáveis farmacocinéticas, a inflamação induzida pela placa bacteriana e a idade. O papel individual de cada um destes fatores na patogênese da lesão permanece pouco conhecido.

Fizemos um levantamento da literatura e resumimos o estudo da influência de cada um desses fatores no CG induzido por CsA.

2.3.1 Genética

A predisposição genética tem importância primária na manifestação do CG induzido por CsA, sendo considerada o fator principal em sua etiologia. Acredita-se que a suscetibilidade do paciente exposto à medicação, à semelhança do que ocorre nos demais CGs induzidos por fármacos, esteja relacionada primordialmente à existência no

tecido gengival de fibroblastos fenotipicamente sensíveis à medicação (TIPTON; STRICKLIN; DABBOUS, 1991).

Hassell e Stanek (1983) realizaram o cultivo primário de seis linhagens de fibroblastos de gengiva normal, e observaram diferenças significantes na síntese de colágeno e glicosaminoglicanos entre elas. Essas diferenças, conservadas ao longo de várias passagens no subcultivo, foram atribuídas à existência de subpopulações específicas de fibroblastos.

Tipton, Stricklin e Dabbous (1987) analisaram 14 linhagens de fibroblastos de gengiva normal sob a ação da CsA e comprovaram a variabilidade, entre indivíduos e intra-linhagem, para a síntese e atividade de collagenase (MMP-1) e de seu inibidor tecidual (TIMP-1).

A heterogeneidade entre subpopulações de fibroblastos gengivais foi posteriormente confirmada por outros pesquisadores (GIANNOPOULOU; CIMASONI, 1996; MCCULLOCH; BORDIN, 1991; SCHOR et al., 1996; SEYMOUR; THOMASON; ELLIS, 1996; STABELLINI et al., 2004). Sob este raciocínio, uma maior ou menor prevalência de subpopulações celulares, mais ou menos sensíveis ao fármaco - justificada pela variabilidade entre indivíduos - estaria caracterizando também a severidade da lesão.

Mais recentemente, Linden et al. (2001) identificaram uma associação entre a severidade do CG induzido pelo uso simultâneo de CsA e nifedipina e o polimorfismo do gene do TGF- β 1. Segundo os autores, o códon 25 do gene representa um determinante genético de CGs mais severos em indivíduos suscetíveis.

É importante considerar que a severidade do CG terá sempre somados a estes aspectos fatores como a agressão da placa bacteriana e a concentração do fármaco, tão importante no plasma quanto topicamente no tecido.

2.3.2 Variáveis Farmacocinéticas

Vários trabalhos comprovaram a relação direta entre a concentração do fármaco e a indução dos fibroblastos suscetíveis ao CG induzido por CsA. Clinicamente, a dose diária do fármaco (2,5 a 20mg/kg), sua concentração plasmática (100 a 400ng/mL), a duração da terapia e a forma de administração já foram analisadas e atribuídas como influentes na manifestação do CG (SEYMOUR; SMITH; ROGERS, 1987; SOMACARRERA et al., 1994).

Os estudos de Daley, Wysocki e Day (1986), que avaliaram longitudinalmente 100 indivíduos usuários de CsA, sugerem que deva existir uma concentração crítica do fármaco para que o paciente sensível desenvolva alteração gengival, e que concentrações superiores a ela não aumentariam significativamente a severidade da lesão. Esta concentração induziria os fibroblastos fenotipicamente suscetíveis a iniciarem a resposta tecidual.

Hefti et al. (1994) também constataram a existência de um nível plasmático do fármaco responsável pela manifestação do CG induzido por CsA. Em seu estudo duplo-cego de dois anos de acompanhamento clínico, 17% dos pacientes com concentrações

plasmáticas de CsA inferiores a 400ng/mL desenvolveram CG. Entre os pacientes com concentrações plasmáticas superiores a essa, a incidência foi de 59%.

As variações entre indivíduos na relação dose/severidade do CG induzido pelo fármaco levam em consideração a farmacocinética de sua distribuição no tecido gengival – mais especificamente no fibroblasto suscetível. Além da distribuição pelo sangue, a veiculação de concentrações do medicamento pelo fluido sulcular gengival e pela saliva foram estudados.

Em estudo do CG induzido pela nifedipina e derivados, Ellis et al. (1995) demonstraram que uma concentração importante do fármaco é liberada da corrente sanguínea para o sulco gengival e que parte desse fluxo é seqüestrada pelo tecido.

No CG induzido por CsA, a análise da saliva não estimulada não conseguiu estabelecer correlação positiva entre concentração do fármaco e severidade do crescimento (KING et al., 1993). Entretanto, na saliva estimulada, McGaw, Lam e Coates (1987) verificaram, em radioimunoensaio, que a concentração de CsA chegou a ser 12 vezes superior àquela do plasma sanguíneo, nos casos de crescimento mais severo. A concentração salivar do fármaco tinha correlação positiva com o índice de placa desses pacientes e com a severidade da lesão. O índice de placa, por sua vez, também tinha correlação positiva com a severidade. Niimi et al. (1990) confirmaram estes achados.

Modéer et al. (1992) verificaram que a exposição do tecido gengival à CsA era 130 vezes maior quando a sua administração ocorria na forma de suspensão oral, comparativamente à forma de cápsulas. Atribuíram grande importância à forma de suspensão na incorporação do fármaco à placa bacteriana.

Diante destas informações, é comum a opinião de que a placa bacteriana funcionaria como reservatório de CsA. As altas concentrações salivares do fármaco seriam liberadas deste reservatório pelo fluxo de saliva estimulada, e estariam associadas à severidade da lesão.

2.3.3 O Papel da Placa Bacteriana

A correlação entre a condição de higiene bucal e a prevalência e severidade dos crescimentos gengivais induzidos por fármacos é, aparentemente, positiva, segundo alguns autores que sugerem um papel importante da placa bacteriana e da inflamação induzida por ela nessas alterações gengivais (ROSS et al., 1989; SOMACARRERA et al., 1994; TYLDESLEY; ROTTER, 1984). Entretanto, Seymour, Smith e Rogers (1987) analisaram a incidência de CG induzido por CsA em 12 pacientes transplantados renais ao longo de seis meses de terapia, e não constataram correlação significativa do índice de placa com o índice gengival, bem como com a severidade do CG. Romito et al. (2004), em análise da condição periodontal de 30 indivíduos transplantados cardíacos, também não encontraram correlação entre índice de placa e presença de CG induzido pela CsA.

Apesar de ser consensual a hipótese da etiologia multifatorial do CG induzido por CsA, em que pesa a inflamação placa-dependente, permanece em questão se a inflamação gengival inicia a lesão ou se é consequência da mesma, por sua morfologia propiciar o acúmulo de placa (PERNU et al., 1993; TYLDESLEY; ROTTER, 1984). Além

disso, Seymour e Smith (1991) já haviam constatado que o controle rígido da placa e a remoção de irritantes não foram capazes de inibir o desenvolvimento do CG induzido por CsA.

Enquanto algumas publicações relacionam a associação de gengivites e periodontites à imunossupressão, tida como fator debilitante (ROSTOCK; FRY; TURNER, 1986; DE CAMARGO, 1989), diversos levantamentos clínicos semelhantes relataram que a condição periodontal dos pacientes envolvia pequena ou nenhuma perda clínica de inserção (SEYMOUR; SMITH; TURNBULL, 1985), bem como parâmetros inflamatórios inalterados (SEYMOUR; SMITH; ROGERS, 1987) ou menores em relação aos pacientes do grupo controle (KARDACHI; NEWCOMB, 1978; PUSTIGLIONI, 2001; SCHÜLLER; FREEDMAN; LEWIS, 1973; TOLLEFSEN; SALTVEDT; KOPPANG, 1978). Estes autores atribuem à imunossupressão um efeito anti-inflamatório favorável ao paciente, responsável por uma diminuição na destruição periodontal.

2.3.4 Idade

Crianças e adolescentes mostram uma maior tendência à manifestação dos crescimentos gengivais induzidos pela CsA (DALEY; WYSOCKI; DAY, 1986; DAVID-NETO et al., 2000) e pela fenitoína (ESTERBERG; WHITE, 1945). Acredita-se que o fator hormonal esteja combinado, intensificando a manifestação da alteração gengival.

Além disso, a morfologia das arcadas dentárias na fase de dentição mista predispõe a um maior acúmulo de placa bacteriana (CARRANZA JR., 1996).

Estudos com fibroblastos gengivais estimulados com CsA sugeriram uma maior metabolização da testosterona em 5α -dihidrotestosterona (5α -DHT) que, por sua vez, foi relacionada à ativação de maior síntese de MEC e menor atividade de collagenases. Os maiores níveis de testosterona tecidual entre adolescentes suportariam a maior prevalência e severidade do CG induzido por CsA observadas nestes pacientes (SOORIYAMOORTHY; GOWER; ELEY, 1990).

2.3.5 Mecanismos de Patogênese

A investigação da manifestação e evolução clínica do crescimento gengival deteve-se a cinco prováveis mecanismos de ação da CsA nos fibroblastos gengivais suscetíveis: 1) alteração na proliferação celular, 2) alteração na síntese de colágeno, 3) inibição de algumas metaloproteinases, 4) alteração na síntese e ativação de citocinas e fatores de crescimento, 5) alteração na síntese de proteoglicanos e glicosaminoglicanos (SEYMOUR; THOMASON; ELLIS, 1996).

2.3.5.1 proliferação celular

Os estudos *in vitro* realizados até o presente momento sugerem que, dentre os parâmetros propostos à investigação do CG induzido por CsA, a proliferação dos fibroblastos seja afetada na presença do fármaco, entretanto existe controvérsia entre os achados publicados, atribuída, em primeira análise, às limitações de cada um desses estudos.

Os ensaios que analisaram fibroblastos gengivais induzidos pela CsA verificaram tanto um aumento (BARTOLD, 1989; COLEY; JARVIS; HASSELL, 1986; FAN; SCOTT, 1989; WILLERSHAUSEN; LEMEN; SCHUMACHER, 1992; ZEBROWSKI; SINGER; BRUNKA, 1986) quanto uma diminuição na taxa proliferativa (SOBHANI; HASSELL; STONE, 1986) ou ausência de influência do fármaco (JAMES; IRWIN; LINDEN, 1995; MCGAW; PORTER, 1988; ROSTOCK; FRY; TURNER, 1986; SCHINCAGLIA et al., 1992; TIPTON; DABBOUS, 1986; YAMAGUCHI et al., 2004). Barber, Savage e Seymour (1992) verificaram que a CsA estimula a proliferação e a biossíntese em fibroblastos de gengiva normal, enquanto não altera esses parâmetros em fibroblastos derivados do CG induzido por CsA, sugerindo que estes não têm comportamento hiperplásico quando estimulados. Recentemente, Cotrim et al. (2003) observaram que a proliferação de fibroblastos estava aumentada sob a ação da CsA e que o processo era modulado por uma estimulação autócrina do TGF- β 1. Entretanto, estes autores analisaram os efeitos da CsA em culturas de fibroblastos de gengiva normal, apenas.

Tipton e Dabbous (1986) atribuíram à heterogeneidade entre as diferentes linhagens de fibroblastos gengivais analisadas as variações em seus resultados.

Entre os estudos que respaldam estas informações, destacamos o de Mariotti et al. (1998), que analisou a ação da CsA e do metabólito hidróxi-CsA sobre a proliferação de fibroblastos gengivais e observou aumento de aproximadamente 30% no número de células. Zebrowski et al. (1988) também analisaram o estímulo da CsA e observaram aumento no DNA total extraído dessas culturas, bem como daquelas estimuladas com fenitoína e nifedipina, o que sugere aumento no número de células nesses experimentos.

2.3.5.2 síntese de colágeno

O acúmulo de colágeno é um achado histológico constante no CG induzido por CsA e a diversidade de métodos empregada em sua investigação não foi capaz de identificar maior atividade em sua síntese, o que desperta a questão da possível relação desse acúmulo a uma deficiência em sua degradação.

Em estudos da ação da CsA sobre a biossíntese por fibroblastos gengivais, observou-se tanto um aumento significativo na produção de colágeno tipo I, em relação ao grupo controle (SCHINCAGLIA et al., 1992; SOBHANI; HASSELL; STONE, 1986; ZEBROWSKI; SINGER; BRUNKA, 1986), quanto a ausência de alteração da mesma (BARBER; SAVAGE; SEYMOUR, 1992; BARTOLD, 1989; COLEY; JARVIS; HASSELL, 1986; JAMES; IRWIN; LINDEN, 1995).

Coley, Jarvis e Hassell (1986) ressaltaram a variabilidade entre as linhagens testadas, visto que a CsA promoveu efeitos distintos entre elas. Estes efeitos se traduziram tanto em aumento quanto em diminuição ou inalteração na síntese de colágeno/proteína.

Redlich et al. (1997), utilizando técnicas bioquímicas e de *northern blotting*, avaliaram a expressão gênica de procolágenos tipo I e tipo III na gengiva de ratos tratados com CsA. Os autores não detectaram alterações na transcrição, e sim uma redução na relação colágeno/DNA, o que sugere que a redução na quantidade de colágeno foi provavelmente ocasionada por degradação aumentada, e não por diminuição na síntese.

Mais recentemente, Hong e Trackman (2002) analisaram a estimulação de fibroblastos de gengiva normal com citocinas que se sabem estar aumentadas no CG induzido por CsA: IL-1 β , IL-6, PDGF-BB e bFGF. Destes, bFGF reduziu a expressão de mRNA do colágeno tipo I num padrão dose-dependente, o que pode vir a esclarecer um provável mecanismo de inibição da síntese desta proteína à medida que os estudos evoluírem.

2.3.5.3 atividade de MMPs

A maioria das investigações histológicas e de biossíntese nos diferentes crescimentos gengivais induzidos por fármacos levaram a constatar que a inibição de algumas MMPs provavelmente seja um dos principais mecanismos de patogênese

dessas lesões, promovendo deficiências na atividade colagenolítica. Maita, Sato e Yamaki (2004), utilizando ELISA, analisaram culturas de fibroblastos do CG induzido por CsA e observaram que a secreção de MMP-1 foi menor quando comparada à gengiva normal e afetada pela periodontite. Também verificaram que o estímulo com CsA, assim como com fenitoína e com nifedipina reduziram significativamente a secreção de MMP-1.

Hassell (1982), em radioimunoensaio, constatou redução na atividade da collagenase imuno-reativa produzida por fibroblastos gengivais induzidos por fenitoína, apesar dos níveis dessa enzima terem sido superiores àqueles produzidos por linhagens comparativas de gengiva normal. O autor atribuiu que, entre as 9 linhagens humanas estudadas, haveria subpopulações que sintetizavam collagenase com atividade reduzida na degradação do colágeno reconstituído. Tipton, Stricklin e Dabbous (1987) comprovaram a heterogeneidade entre suas culturas no estudo da síntese e atividade de MMP-1 sob estímulo da CsA.

Zebrowski et al. (1988) observaram atividade de collagenase inalterada pela CsA entre suas linhagens de fibroblastos gengivais. Fan e Scott (1989) observaram diminuição desse parâmetro em experimento semelhante.

As evidências indicam que os monócitos/macrófagos sejam consideravelmente afetados pela CsA, que interfere na regulação da síntese e da degradação da MEC. Estas células apresentam-se em maior proporção no CG induzido por CsA, assim como todo o componente leucocitário mononuclear (MARIANI et al., 1996).

Tipton, Stricklin e Dabbous (1991) identificaram, em culturas de fibroblastos, um mecanismo de inibição da atividade colagenolítica pela CsA, via interferência na síntese de citocinas por monócitos. Posteriormente, Thomason, Sloan e Seymour (1998),

utilizando imunohistoquímica, confirmaram a redução de MMP-1 no tecido gengival aumentado biopsiado de pacientes usuários de CsA.

Yamada et al. (2000) analisaram a expressão de mRNA por fibroblastos induzidos pela CsA. Utilizando a técnica da reação da polimerase em cadeia (RT-PCR), verificaram a redução da expressão, não só de MMP-1, como também de TIMP-1 e catepsina-L, enzima lisossomal também envolvida na atividade colagenolítica. Pela mesma técnica, Yamaguchi et al. (2004) constataram redução da expressão das catepsinas L, H e B induzida pela CsA. Entretanto, estes autores não observaram alterações significativas na expressão de MMP-1 e TIMP-1.

Paik et al. (2004) analisaram a evolução clínica e histológica do CG induzido pela CsA em ratos e verificaram grande aumento de volume tecidual e de colágeno tipo I. No entanto, as expressões de mRNA para colágeno tipo I e MMP-1 mostraram-se inalteradas. Em ensaio de fagocitose de colágeno, o grupo CsA mostrou redução na atividade fagocitária dos fibroblastos.

Com base nestas informações, o CG induzido por CsA provavelmente está relacionado a uma redução na degradação de componentes da MEC no seu processo de remodelação, responsável pelo seu acúmulo.

2.3.5.4 citocinas e fatores de crescimento

Os mecanismos de imunossupressão da CsA, via regulação na síntese de linfocinas, desencadeiam alterações na síntese de citocinas e fatores de crescimento

por diversas células, incluindo as do tecido gengival (NARES et al., 1996; TIPTON; PABST; DABBOUS, 1990). Os resultados observados sugerem que existem alterações nos níveis dessas moléculas nos casos de CG induzido por CsA, responsáveis não só pela síntese de MEC, como também por sua remodelação.

Sabe-se que IL-6 e IL-1 β são produzidas por fibroblastos gengivais, assim como pelos macrófagos, linfócitos, polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) e queratinócitos teciduais. Estas citocinas têm importância fundamental na remodelação dos tecidos periodontais. Entre suas ações, IL-6 estimula a síntese de colágeno e proteoglicanos, bem como inibidores de MMPs (TIMPs), e a proliferação celular. IL-1 β também desencadeia proliferação de fibroblastos, porém estimula a expressão de MMP-1 e estromelisina (MMP-3), diminuição de TIMPs, ativação de macrófagos/monócitos, PMNs, linfócitos T e B. As duas citocinas são indutoras de reabsorção óssea em determinadas circunstâncias. A orquestração de todas essas funções é dada pelas concentrações críticas e pelas interações dessas moléculas na MEC (RICCELLI et al., 1995).

Atila e Kütükçüler (1998) compararam, utilizando ELISA, os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no fluido sulcular gengival entre indivíduos com CG induzido por CsA e portadores de gengivite, bem como controles saudáveis. Observaram aumento nos níveis de IL-1 β e IL-6 nos casos de CG, porém atribuíram-no à presença de inflamação, e não à ação direta da CsA. Utilizando a mesma metodologia, Spolidorio et al. (2005) observaram, em experimento com ratos, aumento dos níveis de IL-6 e dos fatores de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1) e epidérmico (EGF) na saliva, acompanhando o CG produzido após 60 dias de tratamento com CsA.

Myrillas et al. (1999) analisaram os níveis de IL-1 β e IL-6 no tecido gengival alterado pela CsA. Entre seus achados, constataram níveis maiores de IL-6 no tecido com CG e nas culturas de fibroblastos oriundos desse tecido e sob o estímulo da CsA. Por outro lado, havia uma diminuição dose-dependente na síntese dessas citocinas, tanto pelos fibroblastos oriundos do CG quanto pelos oriundos de gengiva normal. Em culturas de células mononucleares, havia aumento na síntese de IL-6 e inibição na síntese de IL-1 β , enquanto IL-1 β estava aumentada nas amostras teciduais de CG induzido por CsA e na gengiva inflamada. Estes dados ressaltam a provável ação da CsA alterando a orquestração de monócitos/macrófagos sobre a composição da MEC, aumentando seus produtos via síntese de IL-6.

Morton e Dongari-Bagtzoglou (1999) também analisaram, por ELISA, a biossíntese de IL-6 por fibroblastos de gengiva normal estimulados não só por CsA, como também por fenitoína e nifedipina, em associação ou não a IL-1 β , TNF- α e bactérias. Os autores comprovaram que os três fármacos aumentam a secreção de IL-6. A presença dos co-estimulantes testados produziu queda nesse efeito, com exceção da IL-1 β isoladamente, que teve ação sinérgica na síntese de IL-6.

O aumento produzido pela CsA nos níveis de IL-6 também foi demonstrado por análise do mRNA. Williamson et al. (1994), utilizando as técnicas de radioimunoensaio e hibridização *in situ*, detectaram níveis aumentados de IL-6 tecidual no CG induzido por CsA, bem como do mRNA para a proteína, em comparação com o grupo controle. Os autores sugeriram que os fibroblastos são a principal fonte de IL-6 nessa alteração gengival.

Nares et al. (1996) constataram aumento na expressão de fator de crescimento derivado de plaquetas tipo B (PDGF-B) por macrófagos no CG induzido por CsA. Também sintetizado por fibroblastos e outros tipos celulares, este fator de crescimento é um importante quimiotático e indutor da proliferação de fibroblastos e da síntese de glicosaminoglicanos, proteoglicanos, fibronectina e colágeno.

Outro fator de crescimento que se destaca no CG induzido por CsA é o TGF- β , conhecido como o fator fibrogênico em uma diversidade de tecidos conjuntivos humanos e de outros mamíferos. Esta molécula, em suas diferentes isoformas, está aumentada em lesões fibróticas cicatriciais da derme, do fígado e de outros órgãos e nas infecções periodontais.

James, Irwin e Linden (1998) observaram intensa imunolocalização de TGF- β 1 no CG induzido por CsA. Cotrim et al. (2003) observaram, por RT-PCR e ELISA, que TGF- β 1 tem expressão e produção aumentadas em culturas de fibroblastos gengivais humanos estimuladas com CsA. O fator de crescimento produziu um efeito autócrino de redução da expressão de collagenases nessas culturas. Estes achados fortalecem a tese de que a degradação da MEC é reduzida pela CsA. Yoshida, Nagata e Yamane (2005) também constataram que fibroblastos gengivais de rato estimulados por CsA expressam níveis de mRNA aumentados em 130% para TGF- β 1.

Culturas de fibroblastos do tecido gengival normal, quando estimuladas por este fator de crescimento, manifestaram aumento da expressão de moléculas relacionadas com a fibrogênese, tais como colágeno tipo I e o proteoglicano biglicam, sendo este último num padrão muito mais intenso que em culturas de fibroblastos de pele. Também o proteoglicano versicam, mais relacionado com a hipercelularidade, mostrou-se

aumentado pelo TGF- β 1. Já o proteoglicano decorim, conhecido por ser anti-fibrogênico, mostrou expressão diminuída sob o efeito do fator de crescimento (KÄHÄRI; LARJAVA; UITTO, 1991), ou discretamente aumentada (TIEDEMANN; MALMSTROM; WESTERGREN-THORSSON, 1997). O componente de glicosaminoglicanos, tanto de ácido hialurônico quanto em suas formas sulfatadas, mostrou aumento em sua síntese por fibroblastos isolados do CG induzido por CsA e estimulados com TGF- β 1 (STABELLINI et al., 2002).

Quando analisados no fluido sulcular gengival, os níveis de TGF- β de indivíduos com CG induzido por CsA mostraram-se semelhantes aos da gengiva normal (BUDUNELI et al., 2001). Seguindo a mesma análise, os autores observaram mais tarde uma concentração maior de IL-15 no grupo CsA que no controle normal, porém semelhante à observada no grupo comparativo com gengivite (BUDUNELI et al., 2003).

A IL-15 é uma citocina pró-inflamatória sintetizada principalmente por fibroblastos, macrófagos, queratinócitos e células endoteliais. É conhecida por proteger as células da morte programada (apoptose), juntamente com a IL-2 (BULFONE-PAUS et al., 1997). Um dos mecanismos envolvidos nessa proteção parece ser o aumento que a IL-15 promove na expressão de bcl-2, proteína transmembrânica anti-apoptótica (INAGAKI-OHARA et al., 1997). Esta proteína, à semelhança de outras da mesma família, está localizada nas membranas mitocondriais, nucleares e do retículo endoplasmático, e foi identificada no linfoma de células B como reguladora da suscetibilidade celular à morte programada. O papel da IL-15 merece estudo aprofundado, juntamente com outros fatores envolvidos na apoptose, como a proteína

do gene supressor de tumores p53, até o momento caracterizada nos CG induzidos por fenitoína e nifedipina (SAITO et al., 1999).

Entre os sinalizadores do CG induzido pela CsA, estão também KGF e SF (*scatter factor* ou fator de crescimento de hepatócitos), ambos potentes mitógenos de células epiteliais envolvidos em determinadas condições hiperplásicas humanas. Das, Parkar e Olsen (2001) imunolocalizaram o KGF no CG, enquanto sua expressão foi negativa no tecido gengival normal. O mesmo grupo de investigadores mais tarde analisou a expressão do receptor de KGF nos tecidos e em culturas de células epiteliais, e constatou níveis aumentados no grupo CsA, tanto pela análise imunohistoquímica quanto pela expressão de mRNA. A incubação das células com CsA potenciou o efeito (DAS; NEWMAN; OLSEN, 2002). Hyland et al. (2004) também verificaram que o estímulo de fibroblastos gengivais com CsA aumentou a expressão de KGF, bem como de SF.

Outro importante fator proliferativo produzido por fibroblastos, o bFGF, foi analisado em culturas de fibroblastos gengivais de rato estimuladas com CsA e mostrou expressão de mRNA aumentada em 60% (YOSHIDA; NAGATA; YAMANE, 2005). Não existem na literatura dados da mesma análise no tecido gengival humano. Já os efeitos deste fator de crescimento em culturas de fibroblastos gengivais humanos foram analisados por Hong e Trackman (2002), que verificaram redução na expressão de mRNA para colágeno tipo I e lisil-oxidase de maneira proporcional à dose e ao tempo de exposição. Os autores não constataram influência significativa dos demais estimulantes testados, IL-1 β , IL-6 e PDGF-BB. Este é o único ensaio de biossíntese de fibroblastos gengivais estimulados pelo bFGF. A análise do efeito deste e demais

fatores nos tecidos periodontais está apenas começando e as limitações de um único estudo *in vitro* não permitem conclusões definitivas, sendo necessários estudos complementares.

2.3.5.5 síntese da matriz não colagênica

A composição básica da MEC dos tecidos conjuntivos compreende um grande domínio de proteínas fibrosas (colágeno e, em menor proporção, elastina) embebidas em um gel hidrofílico de polissacarídeos associados ou não a proteínas. As proteínas não fibrilares da MEC subdividem-se em: 1) glicoproteínas alongadas (destacando-se fibronectina, laminina, tenascina, integrinas), responsáveis pela aderência entre as células e a matriz e outras interações; 2) proteoglicanos, glicosaminoglicanos e outros componentes eventuais, como fatores de crescimento, citocinas, hormônios, nutrientes e minerais, completando o conjunto supramolecular.

Os proteoglicanos (PGs) são macromoléculas complexas encontradas em todos os tecidos. Sua estrutura é constituída de um corpo protéico central alongado no qual se inserem, por ligação covalente, uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos. A carga elétrica destas moléculas é altamente negativa e responsável por regular uma variedade de funções no tecido, tais como: fibrilogênese, organização dos feixes colagênicos, modulação da atividade de fatores de crescimento, angiogênese, aderência celular e retenção hídrica (IOZZO, 1998).

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são polímeros lineares de dissacarídeos. Sua estrutura molecular contém sempre e invariavelmente uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina) e um ácido hexurônico (glucurônico ou idurônico) ou uma galactose em seqüência não ramificada que apresenta substituições de grupamentos sulfato em várias posições da cadeia polissacarídica (CARNEY; MUIR, 1988).

Os GAGs subdividem-se em 4 famílias de acordo com a estrutura química de seus dissacarídeos: a) ácido hialurônico; b) condroitin sulfato e dermatan sulfato, c) queratan sulfato, d) heparan sulfato e heparina. Estes últimos têm a mesma estrutura básica de dissacarídeos poliméricos e sua diferenciação deve-se à grande variedade de funções desempenhadas por cada um deles de maneira independente e, algumas situações, conjuntamente. Com exceção do ácido hialurônico, os demais GAGs encontram-se ligados a um corpo protéico, compondo a ampla variedade de PGs. A presença de radicais carboxila e sulfato (com exceção feita ao ácido hialurônico e à heparina) é o fator responsável pela carga negativa elevada dos GAGs, mantenedora de sua grande atratividade por cátions e hidrofília. Além disso, interações dos grupamentos ácidos destas moléculas com radicais básicos do colágeno também têm grande importância estrutural na MEC como um todo (CARNEY; MUIR, 1988).

No tecido gengival, as famílias condroitin sulfato, heparan sulfato, dermatan sulfato e ácido hialurônico foram identificadas por Bartold (1987). Posteriormente, PGs do tipo decorim, biglicam, versicam e perlecam foram caracterizados nesse tecido (GNOATTO et al., 2003; BARTOLD, 1995; LARJAVA; HAKKINEN; RAHEMTULLA, 1992; HAASE et al., 1998).

A grande variedade de PGs - com estruturas constituídas de diferentes corpos protéicos e de diferentes famílias, tamanhos e números de GAGs - certamente contribui

para as distintas funções biológicas atribuídas a estes compostos. O GAG heparina, entre sua diversidade de funções, regula o metabolismo de glicoproteínas como a trombina e o plasminogênio, que estão presentes nas membranas basais e acredita-se que desempenhem importantes funções no controle do fenótipo celular e angiogênese (BAR-SHAVIT et al., 1993).

A interação dos PGs com substâncias específicas da MEC de cada um dos tecidos de que fazem parte modula qualitativa e quantitativamente essas funções. Assim, a atividade de cada uma destas macromoléculas está relacionada não só com a sua estrutura molecular, mas também com sua localização (HARDINGHAM; FOSANG, 1992).

Inicialmente, os PGs eram classificados com base nos GAGs que os compunham (POOLE, 1986), de modo que sua nomenclatura consistia na identificação da cadeia predominante dessas moléculas (por exemplo, proteoglicanos dermatan sulfato). O avanço das metodologias de biologia molecular permitiu que as seqüências de aminoácidos dos corpos protéicos de diversos PGs fossem conhecidas, de maneira que a classificação dos PGs passou a ser mais relacionada à composição protéica do corpo central ou à localização destas macromoléculas no tecido (HARDINGHAM; HENG; GRIBBON, 1999). Com base neste último aspecto, os PGs são classificados em extracelulares (ou de MEC), de superfície celular e intracelulares.

Os PGs extracelulares são organizadores da MEC e subdividem-se em interfibrilares (ou hialectanos), fibrilares (pequenos PGs ricos em leucina) e de membrana basal (IOZZO, 1998). Os interfibrilares localizam-se entre as malhas formadas pelos feixes de fibrilas colagênicas, configurando agregados de grande

massa molecular que promovem pontes entre as células e a MEC. Destacam-se nesta subclasse os PGs dos tipos versicam, agrecam, neurocam e brevicam.

Os PGs fibrilares estão ligados covalentemente às fibras e fibrilas colagênicas, não formam agregados, possuem regiões ricas em leucina e pequena massa molecular. Sua função principal relaciona-se com a fibrilogênese e organização dos feixes colagênicos. Seus principais representantes são decorin, biglicam, fibromodulin e lumican, tendo destaque nos tecidos periodontais (BARTOLD, 1995; HAASE et al., 1998; LARJAVA; HAKKINEN; RAHEMTULLA, 1992).

Os PGs de membrana basal têm como principal representante o PG heparan sulfato denominado perlecan, de grande massa molecular, encontrado na maioria das membranas basais epiteliais e vasculares do organismo humano (MOHAN; SPIRO, 1991). Predominantemente do tipo heparan sulfato, pode também caracterizar-se por possuir domínio(s) condroitin sulfato e, raramente, dermatan sulfato, como foi observado em estudo recente por Knox et al. (2005). Além de fornecer suporte estrutural à interface que separa os distintos tecidos, este PG funciona como um arcabouço estrutural que guia e regula a angiogênese mediante fatores de crescimento como o bFGF (WHITELOCK et al., 1996).

Os PGs de superfície celular incluem a família dos sindecans e o betaglicam, que fazem parte do nosso estudo. Além destes, compreendem as famílias dos glipicans, CD44, a serglicina e a trombomodulina.

A família dos sindecans (SDC) é constituída de 4 diferentes tipos conhecidos, expressos em uma variedade de células. Apresentam domínios intracelulares, transmembrânicos e extracelulares, sendo que entre estes últimos encontramos sítios de ligação a GAGs sensíveis a diversas proteases (BERNFELD et al., 1992). Assim

como o perlecam, são PGs do tipo heparan sulfato e ligam-se com alta afinidade e especificidade ao bFGF (CHERNOUSOV; CAREY, 1993), ao colágeno, à fibronectina, à trombospondina e à tenascina. São eles: SDC-1, SDC-2 (ou fibroglicam), SDC-3 (ou N-sindecam) e SDC-4 (riudocam ou anfiglicam). Os GAGs constituintes dos SDCs variam de acordo com o tipo.

O betaglicam é também denominado receptor de fator de crescimento transformador beta tipo III (TGF- β tipo III) e contém cadeias tanto de heparan sulfato quanto de condroitin sulfato (CHEIFETZ; MASSAGUE, 1989). Este PG é encontrado na maioria das células do organismo e sua ligação ao fator de crescimento ocorre mediante seu corpo protéico. Suas cadeias de heparan sulfato ligam-se, por sua vez, ao fator de crescimento básico de fibroblastos - bFGF (LOPEZ-CASILLAS; WRANA; MASSAGUE, 1993). O betaglicam atua, portanto, como um importante reservatório de fatores de crescimento e suas funções relacionam-se, de certa maneira, com as dos SDCs.

Especificamente no CG induzido por CsA, a investigação do componente não colagênico da MEC iniciou-se com as observações histológicas de um acúmulo significativo de PGs e GAGs, em associação com os componentes colagênico e vascular aumentados (MARIANI et al., 1993).

Outros estudos analisaram semiquantitativamente os GAGs, no intuito de elucidar sua participação na matriz alterada. A literatura relaciona poucos trabalhos quantificando esses compostos diretamente a partir de sua extração do tecido.

Rocha et al. (2000) analisaram, por eletroforese e densitometria, a quantidade dos GAGs após seu isolamento por reação enzimática do tecido biopsiado de 4

indivíduos com CG induzido por CsA. Não encontraram diferença em relação aos controles de gengiva normal. Posteriormente, analisaram a composição e a distribuição de peso molecular desses GAGs comparativamente ao CG induzido por nifedipina e à gengiva normal, não encontrando diferenças entre eles (MARTINS et al., 2003).

Os demais estudos publicados analisaram a síntese de GAGs por fibroblastos gengivais em culturas estimuladas pela CsA.

O primeiro deles foi publicado por Bartold (1989), analisando a incorporação de prolina triciada por fibroblastos estimulados com CsA. O autor não constatou aumento significativo na síntese de proteína e PGs. Barber, Savage e Seymour (1992), em um estudo similar, chegaram às mesmas conclusões.

Willershausen, Lemen e Schumacher (1992) verificaram que a CsA promoveu um aumento da síntese total de GAGs, em especial do ácido hialurônico, por fibroblastos gengivais, cultivados por 72 horas, bem como a longo prazo (6 semanas). Entretanto, esse aumento não foi proporcional à proliferação celular, representando, na verdade, um declínio relativo dessa matriz.

Mariotti et al. (1998) observaram síntese de colágeno diminuída em 37% pelos fibroblastos gengivais estimulados com CsA, apesar da síntese de proteína total permanecer inalterada, sugerindo a existência de aumento na proporção de matriz não colagênica.

Outros estudos nessa linha de pesquisa identificaram forte influência das condições de cultivo na análise da biossíntese. Zebrowski et al. (1994), analisando a incorporação de glicosamina triciada à MEC depositada, constataram que a exposição à CsA aumentava genericamente a síntese de GAGs por fibroblastos gengivais normais

e de uma única linhagem oriunda de um indivíduo diabético com CG induzido por CsA e nifedipina, simultaneamente .

Newell e Irwin (1997) verificaram heterogeneidade entre as 3 linhagens de fibroblastos derivados de CG induzido por CsA, e a estimulação das culturas com o fármaco promoveu um aumento na síntese de GAGs restrito a 2 das 3 linhagens e às culturas subconfluentes apenas. Recentemente, Stabellini et al. (2004) verificaram o componente de GAGs totais e frações sulfatadas em maior quantidade no CG induzido por CsA, em comparação com controles não afetados, em análise de microscopia eletrônica de transmissão e da biossíntese em culturas de fibroblastos. Entretanto, a suscetibilidade genética inerente à linhagem do fibroblasto também é ressaltada por estes autores, e talvez possa justificar a grande variabilidade entre os estudos relatados.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo objetivou analisar a expressão de proteoglicanos sulfato de superfície celular e do componente de GAGs no tecido gengival humano alterado pela CsA, em comparação com a gengiva de indivíduos não usuários de fármacos.

4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Participaram deste estudo 30 pacientes das Clínicas de Pós-Graduação e Especialização em Periodontia da Faculdade de Odontologia - USP e da Divisão de Odontologia do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina - USP. Estes pacientes constituíram 2 grupos:

Grupo Ciclosporina-A (CsA): constituído de 15 indivíduos transplantados, 11 renais e 4 hepáticos, usuários de CsA (dose diária: 2,5 a 5,0 mg/kg) manifestando crescimento gengival, sendo 7 do sexo feminino e 8 do sexo masculino, com idades variando entre 20 e 64 anos (mediana=36). Na fase de exame e avaliação periodontal, foi registrado o grau de severidade do CG com base em uma adaptação do índice proposto por Aas (1963) para pacientes usuários de fenitoína. Os critérios deste índice estão expostos na tabela 4.1 e ilustrados na figura 4.1.

Amostras gengivais da área afetada por crescimento clínico tecidual moderado ou severo foram cedidas para análise mediante consentimento pós-informado do paciente, no momento da cirurgia corretiva da deformidade anatômica, inserida no seu plano de tratamento periodontal.

Grupo Controle (Ctr): constituído de 15 indivíduos não usuários de fármacos, sendo 9 do sexo feminino e 6 do sexo masculino, com idades variando entre 38 e 50 anos (mediana=40). Amostras de tecido gengival nunca antes exposto a tratamento com CsA foram cedidas, mediante consentimento pós-informado,

durante procedimentos cirúrgicos pré-protéticos de rotina da Clínica (por exemplo, cirurgias ressectivas com finalidade de aumento de coroa clínica).

Para a análise de GAGs e da expressão gênica de PGHSs, as amostras gengivais foram conservadas a -80°C até sua utilização nos experimentos. Para a caracterização imunohistoquímica, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4%.

Tabela 4.1 -Índice de severidade do CG (adaptação do índice de AAS, 1963)

Grau	Critério
0	ausência de crescimento; gengiva marginal com conformação de “lâmina de faca”
1	CG leve: abaulamento (edema) da gengiva marginal
2	CG moderado: recobrimento menor que 1/3 do comprimento coronário
3	CG severo: recobrimento maior que 1/3 do comprimento coronário

Figura 4.1 - Condição clínica gengival classificada por graus de severidade: **0**, gengiva normal; **1**, CG leve; **2**, CG moderado; **3**, CG severo

4.1.1 Critérios de Exclusão

Foram excluídos indivíduos com história de utilização recente de fenitoína, valproato de sódio, nifedipina, diltiazem, verapamil e/ou antibióticos azalídeos, reconhecidos por interferirem na composição da matriz extracelular. Casos clínicos de CG leve também não fizeram parte da casuística.

4.1.2 Aspectos Éticos

Este trabalho dá continuidade à linha de pesquisa que analisou PGs de matriz extracelular na mesma casuística (GNOATTO et al., 2003). O projeto e o termo de consentimento pós-informado foram submetidos ao Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia - USP e aprovados (Anexo A).

Os pacientes do grupo CsA estiveram inseridos em um programa de cooperação entre a Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia - USP, a Divisão de Odontologia do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina - USP e as Unidades de Transplante Renal e de Fígado do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina - USP. O tratamento periodontal destes pacientes foi conduzido sob completo acompanhamento do médico responsável.

No termo de consentimento pós-informado constavam todas as informações necessárias acerca dos objetivos do estudo, do protocolo de tratamento periodontal

e da conduta de encaminhamento posterior à sua conclusão, além da utilização do tecido gengival removido para análise.

Fazia parte do esclarecimento dos pacientes do grupo CsA a inclusão de cobertura antibiótica profilática em seu plano de tratamento, determinada pelo médico responsável. Importa ressaltar que, das opções de antibióticos propostas, foi excluída a utilização da azitromicina, reconhecida por interferir na patogênese do CG (PUIG et al., 1997; WIRNSBERGER et al., 1998).

4.2 Métodos

Os experimentos de análise de GAGs e de expressão gênica foram executados no Laboratório Clínico do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina - USP, gentilmente concedido pela Profa. Dra. Célia M. C. Strunz. O processamento histológico das amostras e os experimentos de imunohistoquímica foram executados sob a orientação da Profa. Dra. Aldina Barral, no Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ - Salvador, Bahia e da Profa. Dra. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa, no Laboratório de Imunohistoquímica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia - USP.

4.2.1 Análise da Expressão Transcricional dos PGHSs

Estes experimentos utilizaram as amostras clínicas de tecido gengival dos indivíduos dos grupos CsA e Ctr, que foram descongeladas no momento de sua execução e mantidas a 4°C durante toda sua manipulação. Todas as determinações foram executadas em quintuplicata e em condições isentas de RNase.

4.2.1.1 isolamento do RNA total

O RNA total das amostras foi extraído utilizando-se o método do TRIzol conforme instruções do fabricante (GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA). Em resumo, as amostras foram suspensas em TRIzol na proporção de 1mL do reagente para 100mg de tecido e a mistura foi homogeneizada em politron (Ultra-Turrax T25, Ika-Labortechnik, Alemanha) utilizando dois pulsos por segundo, a 4°C. A seguir, foi adicionado 0,2mL de clorofórmio para cada 1mL de TRIzol utilizado e as amostras foram centrifugadas (12.000 x g, 15 minutos, 4°C). À fase aquosa foi adicionado 0,5mL de isopropanol para cada 1mL de TRIzol, sendo em seguida centrifugada (12.000 x g, 15 minutos, 4°C). O precipitado obtido (RNA total) foi lavado com etanol 75% e re-suspenso em água destilada tratada com dietil-pirocarbonato (DePC; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

O conteúdo de RNA foi quantificado por absorbância em espectrofotômetro (GeneQuant pro RNA/DNA Calculator, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala,

Suécia). Consideramos que uma unidade de absorbância a 260nm corresponde a 40µg/mL de RNA. A relação de absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280nm do RNA total foi calculada para nos certificarmos da ausência de contaminação protéica.

A integridade do RNA de cada amostra foi analisada eletroforéticamente em gel de agarose 1%, em tampão tampão tris-borato-EDTA (TBE; 50mM Tris base, 50mM ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8). As amostras cujas bandas ribossomais 28S e 18S estavam íntegras foram armazenadas a -80°C até sua utilização para a síntese da 1ª fita de DNA complementar (cDNA).

4.2.1.2 obtenção da 1ª fita de cDNA

O RNA total serviu de molde para a síntese de cDNA (transcrição reversa), utilizando o kit Superscript II (GIBCO BRL, Life Technologies). A 1ª fita de cDNA foi preparada utilizando-se 5µg do RNA total, 0,5 U da enzima transcriptase reversa e iniciadores randômicos (*random hexamer primers*), em volume final de 20µL. Esta mistura foi incubada seqüencialmente a 42°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos, e 4°C por 1 minuto. O cDNA foi armazenado a -20°C até sua utilização nas reações de polimerase em cadeia.

4.2.1.3 reação de polimerase em cadeia qualitativa

A reação de polimerase em cadeia (PCR) foi realizada com cDNA em volume de 1µL, 0,4mM dos nucleotídeos dGTP;dATP;dTTP dCTP, 0,2µm de cada iniciador, 1,5mM de MgCl₂ e 1,25U da enzima Taq DNA polimerase em tampão de PCR (kit Superscript II, GIBCO BRL, Life Technologies), em volume final de 25µL. A tabela 4.2 mostra as seqüências dos pares de iniciadores, obtidas de publicações do seqüenciamento do cDNA humano, para SDC-2 (WORAPAMORN et al., 2001b), SDC-4 (KANEIDER et al., 2002) e betaglicam (CIARMELA et al., 2003). Iniciadores para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, gene constitutivo, HODGES; CHIPMAN, 2002) foram utilizados para a padronização de expressão não regulada.

A mistura de reação foi amplificada em termociclador PCR PTC-200 Peltier (MJ Research, Watertown, MA, EUA) utilizando o seguinte programa: desnaturação por 5 minutos a 94°C; 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C (hibridização dos iniciadores) e 1 minuto a 72°C (síntese da cadeia); extensão final por 10 minutos a 72°C; refrigeração a 4°C.

Após as reações, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE contendo brometo de etídio (10µg/mL), utilizando padrão de DNA com 100 pares de bases (GIBCO BRL, Life Technologies). A visualização dos produtos de PCR no gel foi feita por meio do sistema EagleEye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA) e a densitometria das bandas pelo programa Quantity One 4.1.0 (BioRad, Hercules, CA, EUA).

Tabela 4.2 - Descrição dos iniciadores utilizados. pb, pares de bases

Molécula	Iniciador		Nº pb
GAPDH	senso:	5' AACGGGAAGCTCACTGGCATG 3'	305 pb
	anti-senso:	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTAG 3'	
SDC-2	senso:	5' GGGAGCTGATGAGGATGTAG 3'	394 pb
	anti-senso:	5' CACTGGATGGTTTGC GTTCT 3'	
SDC-4	senso:	5 CGAGAGACTGAGGTCATCGAC 3'	528 pb
	anti-senso:	5' GCGGTAGAACTCATTGGTGG 3'	
betaglicam	senso:	5' CTGTTACCCGACCTGAAAT 3'	502 pb
	anti-senso:	5' CGTCAGGAGGCACACACTTA 3'	

4.2.1.4 identificação dos produtos de PCR

Para a confirmação da identidade, os produtos amplificados de PCR foram submetidos à digestão pelas seguintes enzimas de restrição, cujos produtos têm tamanhos conhecidos: Hinc II (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para o SDC-2; Xba I para o SDC-4; Afl III (New England, Biolabs Inc., Beverly, Mass., EUA) para o betaglicam; Apa I (Promega Corp., San Luis Obispo, CA, EUA) para GAPDH. Todas as incubações seguiram as condições descritas pelo fabricante.

Os produtos da digestão pelas enzimas foram visualizados em gel de agarose 1% e documentados pelo sistema EagleEye II (Stratagene).

4.2.1.5 PCR semiquantitativo

4.2.1.5.1 determinação da faixa linear de amplificação dos genes

A faixa linear de amplificação dos genes foi determinada utilizando-se um *pool* do cDNA do grupo Ctr. Para cada par de iniciadores (tabela 4.2), realizamos PCR por 18, 21, 24, 27, 30, 35 e 40 ciclos de amplificação. Os produtos de cada uma das amplificações foram visualizados em gel de agarose 1%. Após a densitometria das bandas, determinamos a faixa linear de amplificação para cada gene e escolhemos um número de ciclos cujo produto estivesse dentro dessa faixa. A condição assim determinada foi a utilizada para as posteriores amplificações em ambos os grupos (CsA e Ctr).

4.2.1.5.2 amplificação dos cDNAs

Este experimento utilizou amostras representativas de cDNA de cada um dos grupos do estudo, formando-se um *pool* de cDNA (6 indivíduos do grupo CsA e 9 indivíduos do grupo Ctr). Essas amostras foram amplificadas para cada gene com quantidade fixa de cDNA (1µg). Os parâmetros da reação (reagentes e etapas de termociclagem) foram padronizados conforme as condições estabelecidas no item anterior, de modo a permitir comparações diretas entre as densidades das bandas

amplificadas. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose, documentados e densitometrados. Uma área de tamanho padronizado foi definida para cada conjunto de bandas no cálculo da densitometria. A “densidade de fundo” do gel (*background*) foi registrada em uma área idêntica e descontada dos cálculos. Os resultados expressos representam a densidade de cada banda relativa à densidade do GAPDH. Para este gene, a densidade relativa foi considerada 100%, uma vez que o GAPDH é o padrão interno de cada gel (gene constitutivo), representativo da expressão não regulada pela CsA.

4.2.2 Análise de GAGs Teciduais

4.2.2.1 extração e eletroforese

Amostras gengivais foram descongeladas, tiveram sua massa determinada em balança de precisão e foram cortadas com bisturi em fragmentos menores. Em seguida, foram incubadas em suspensão com 10 volumes de acetona a 5°C por 24 horas, para desidratação e eliminação de lipídios neutros e substâncias lipossolúveis. Após centrifugação (7000 rpm, 20 minutos a 4°C) e secagem a vácuo, o material resultante teve sua massa definitiva determinada em balança (massa seca).

Os GAGs foram isolados mediante incubação a 37°C com a enzima tripsina por 18 horas. A tripsina é uma protease inespecífica utilizada na degradação do

esqueleto protéico dos diferentes PGs. Esta degradação permite liberar as cadeias de GAGs intactas. Para cada 50 mg de tecido foi adicionado 1mL de solução tampão de tripsina (10mg/mL). Para a completa liberação das cadeias dos GAGs, foi feita a hidrólise alcalina da suspensão com NaOH 1,0N (pH 11,0) por 8 horas em temperatura ambiente, seguida de neutralização com HCl (pH 6,0). O homogenato foi centrifugado por 15 minutos a 5.000 rpm e o sobrenadante foi precipitado com etanol absoluto por 12 horas a 4°C.

O precipitado contendo GAGs foi re-suspenso em água ultra pura (MilliQ – Millipore, Billerica, MA, USA) e parcialmente identificado e analisado em gel de agarose 0,5% em tampão 1,3-diaminopropano-acetato 50mM, pH 9,0. O gel foi feito em lâminas de 7,5 x 5,0 x 0,2cm, onde as amostras foram aplicadas. A eletroforese foi realizada em sistema de cuba horizontal (modelo Dietrich para eletroforese de proteína, confecção por Sr. Hans Zepa) por 1 hora a 75 volts, em presença de éter de petróleo (benzina) para que o tampão permanecesse resfriado (4°C a 5°C). A precipitação dos GAGs no gel de agarose foi feita pela imersão em N-cetil-N,N,N-trimetil amônio brometo (cetavlon) 0,1%, por 12 horas.

As lâminas foram secas sob ventilação e coradas em solução de azul de toluidina 0,1% / etanol 50% / ácido acético 1%, por 15 minutos. Em seguida foram lavadas duas vezes em solução de etanol 50% / ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Este procedimento permitiu o fracionamento das 3 famílias de GAGs sulfatados (condroitin sulfato, dermatan sulfato e heparan sulfato) em bandas distintas ao longo do mesmo gel.

4.2.2.2 degradação dos GAGs por reação enzimática e química

Foram realizados ensaios de degradação enzimática (Sigma Chemical Co.) em amostras representativas dos grupos CsA e Ctr, para a confirmação da identidade das bandas relativas às 3 diferentes famílias de GAGs sulfatados.

- Condroitinase ABC: degrada especificamente os condroitin 4 e 6-sulfatos, dermatan sulfato e ácido hialurônico. A sua ação sobre os condroitin sulfatos forma dissacarídeos insaturados 4 e 6-sulfatados, e sobre o ácido hialurônico forma dissacarídeos insaturados não sulfatados. A condroitinase ABC degrada as ligações glicosídicas entre N-acetil-hexosaminas e os ácidos D-glucurônico ou L-idurônico, atuando sobre o dermatan sulfato.

- Condroitinase AC-I: degrada os condroitins 4 e 6-sulfatos e o ácido hialurônico. Nos condroitin 4 e 6-sulfatos, após a ação enzimática, formam-se dissacarídeos insaturados 4 e 6-sulfatados. A sua ação ocorre especificamente sobre ligações glicosídicas entre N-acetil-hexosaminas e ácido glucurônico, portanto não atua sobre o dermatan sulfato.

- Heparitinase-III: degrada o heparan sulfato em dissacarídeos distintos.

Amostras com 100µg de GAGs foram degradadas com 0,1U das condroitinases ABC e AC-II separadamente, em tampão Tris-acetato 0,1M (pH 7,3) a 37°C, por 24 horas. Amostras com 100µg de GAGs foram degradadas com 0,1U de heparitinase-III em tampão acetato de amônio 50mM (pH 7,0) a 30°C, por 24 horas.

A degradação dos compostos pela condroitinase ABC foi constatada pelo desaparecimento das bandas correspondentes aos condroitins 4 e 6-sulfatos e ao dermatan sulfato no gel de agarose, enquanto a degradação pela AC-II foi

identificada pelo desaparecimento da banda correspondente aos condroitins 4 e 6-sulfatos apenas. A ação da heparitinase-III foi constatada pelo desaparecimento da banda equivalente ao heparan sulfato.

4.2.2.3 análise densitométrica

As lâminas contendo os géis de eletroforese representativos de cada um dos grupos foram analisadas por densitometria em 530nm utilizando-se o sistema EagleEye II (Stratagene). Foram analisadas amostras de 11 indivíduos do grupo CsA e 7 do grupo Ctr, tomadas aleatoriamente. A análise foi feita de maneira semiquantitativa e comparativamente a uma amostra padrão de concentrações conhecidas das 3 diferentes famílias de GAGs sulfatados. As densidades das bandas correspondentes a cada uma das 3 famílias de GAGs sulfatados foram divididas pela densidade da banda do padrão de massa conhecida no mesmo gel de agarose. Os resultados de densidade relativa foram utilizados na comparação entre os 2 grupos do estudo.

4.2.2.4 dosagem de GAGs sulfatados totais

Alíquotas contendo 50µL de suspensões de GAGs representativas dos grupos CsA e Ctr foram analisadas por espectrofotometria em 525nm após reação com

DMMB (azul de 1,9,dimetilmetileno, Sigma Chemical Co.). Este método, descrito por Farndale, Butta e Barrett (1986) é utilizado na determinação de GAGs sulfatados. As curvas de calibração do espectrofotômetro partiram de uma suspensão inicial de condroitin 4-sulfato (C4S, Sigma Chemical Co.) 0,1mg/mL que foi diluída em concentrações de trabalho de 1µg/mL, 2,5µg/mL, 5µg/mL, 7,5µg/mL e 10µg/mL. Os resultados foram expressos em µg de GAGs /mg de tecido.

4.2.3 imunolocalização dos HSPGs de Superfície Celular

Mediante imunolocalização, confirmamos a presença dos HSPGs SDC-2 e SDC-4, no tecido gengival de nossa casuística. Amostras gengivais de 2 indivíduos do grupo CsA e 5 do grupo controle foram analisadas após reações imunohistoquímicas. As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 14 horas, processadas e incluídas em parafina.

Cortes de 3µm foram estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxisilano (ref. A3648, Sigma Chemical Co.). Os cortes foram desparafinizados, re-hidratados e imersos em ácido cítrico 10mM (pH 6,0) à temperatura ambiente por 30 minutos para recuperação antigênica. A inativação da peroxidase endógena foi feita mediante imersão em solução de peróxido de hidrogênio 6% em metanol 1/1. O tampão utilizado foi Tris-HCl 0,05M adicionado de Tween 20 0,05% (pH 7,6) em todas as etapas das reações. Estas foram realizadas em Auto-stainer (Universal Staining System, Dako Co., Carpinteria, CA, EUA).

As lâminas contendo os cortes foram incubadas por 40 minutos com os anticorpos anti-SDC-2 e anti-SDC-4 humano policlonais produzidos em cabra (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA), na diluição de 1:200. Foram então incubadas com o anticorpo secundário do kit LSAB®+ System-HRP (ref. K0690, Dako Co.). Os cortes foram revelados com solução Liquid DAB (ref. K3468, Dako Co.) por 10 minutos e contracolorados com hematoxilina de Mayer por 10 minutos. Após desidratação e diafanização, foi feita a montagem das lâminas e a análise em microscópio de luz. Além das amostras gengivais dos 2 grupos do estudo, as reações foram conduzidas com controles negativos na ausência dos anticorpos primários e com controles positivos constituídos de reações com amostras de tecido nervoso e estômago humanos.

4.2.4 análise dos resultados

A normalidade da distribuição da amostra foi analisada utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Uma vez constatada a distribuição normal, os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student, utilizando-se o programa SPSS versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Fixou-se em 5% ($p \leq 0,05$) o nível para a rejeição da hipótese de nulidade (nível de significância).

5 RESULTADOS

5.1 Casuística

Entre os pacientes do grupo CsA, 10 (66%) apresentaram CG moderado e 5 (33%) CG severo.

5.2 Caracterização dos produtos de PCR

5.2.1 Integridade do RNA total

O RNA total extraído das amostras gengivais de ambos os grupos estava isento de proteína, uma vez que a razão entre as absorbâncias nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm estavam entre 1,6 e 1,8. Através da eletroforese do RNA total em gel de agarose 1%, verificou-se que os RNAs estavam íntegros (figura 5.1).

Figura 5.1 - Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras de RNA total. CsA, grupo ciclosporina-A; Ctr, grupo controle; 28S e 18S, bandas correspondentes ao RNA ribossomal das subunidades 28S e 18S

5.2.2 RT-PCR qualitativa

A figura 5.2 mostra os resultados das eletroforeses em gel de agarose características dos produtos de amplificação da PCR qualitativa, obtidos a partir de cDNAs das amostras dos grupos CsA e Ctr.

5.2.3 Identificação dos produtos da PCR qualitativa

A figura 5.3 mostra o resultado da digestão com as enzimas de restrição dos produtos amplificados pela PCR para SDC-2, SDC-4 e betaglicam. Os fragmentos dos produtos da digestão, separados por eletroforese em gel de agarose 1%, confirmaram a identidade dos genes.

Figura 5.2 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados pela PCR qualitativa, obtidos a partir dos pools de cDNAs das amostras do grupo Ctr (colunas ímpares) e CsA (colunas pares) para os PGHSs estudados. 1 e 2, SDC-2 (394 pb); 3 e 4, SDC-4 (528 pb); 5 e 6, betaglicam (502 pb); 7 e 8, GAPDH (305 pb).

Figura 5.3 - Eletroforese em gel de agarose 1% representativa dos produtos de amplificação submetidos à ação das enzimas de restrição. P, padrão de 100 pares de bases (pb); 1, SDC-2 (395 pb); 2, SDC-2 após digestão com a enzima Hind II (66 e 329 pb); 3, SDC-4 (528 pb); 4, SDC-4 após digestão com a enzima Xba I (189 e 339 pb); 5, betaglicam (502 pb); 6, betaglicam após digestão com a enzima Af III (170 e 332 pb); 7, GAPDH (305pb); 8, GAPDH após digestão com a enzima Apa I (133 e 172 pb).

5.2.4 Determinação da faixa linear de amplificação dos PGHSs

A figura 5.4 representa as curvas com ciclos crescentes de amplificação para os produtos de PCR de GAPDH, SDC-2, SDC-4 e betaglicam. O número de ciclos escolhido para as amplificações foi de 24 para o GAPDH, e 35 para os PGHSs.

5.2.5 A expressão gênica dos PGHSs é maior no grupo CsA em relação o Ctr

A tabela 5.1 mostra a validação do método de RT-PCR utilizado para os genes estudados, na qual foram avaliados os coeficientes de variação intra e inter-reações.

A tabela 5.2 mostra maiores quantidades de mRNA constatadas para SDC-2 (2,65 vezes), SDC-4 (4 vezes) e betaglicam (1,5 vezes) no grupo CsA, quando comparado ao grupo Ctr ($p < 0,0001$).

Figura 5.4 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação pela PCR do pool de amostras do grupo Ctr. O gráfico representativo mostra o número de ciclos escolhido para o experimento (seta)

Tabela 5.1 - Estatística descritiva dos resultados do RT-PCR para SD2-2, SDC-4 e betaglicam. Os valores referem-se à densidade relativa (densidade da banda no gel de agarose da amplificação do gene / densidade da banda de GAPDH no mesmo gel). CsA, grupo

	SDC-2		SDC-4		betaglicam	
	Ctr	CsA	Ctr	CsA	Ctr	CsA
n	10	10	10	10	10	10
Média	0,083	0,220	0,131	0,535	0,619	0,882
Desvio padrão	0,008	0,045	0,013	0,152	0,100	0,098
CV	9,9%	20,5%	9,8%	28,4%	16,1%	11,1%

Tabela 5.2 - Resultados da densitometria dos produtos da rt-pcr semiquantitativa dos pghss. CsA, grupo ciclosporina-a; Ctr, grupo controle. Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio padrão das densidades relativas (densidade da banda no gel de agarose da amplificação dos genes / densidade da banda do gapdh no mesmo gel). Os grupos foram comparados pelo teste t de student (p).

	CsA Densidade relativa	Ctr Densidade relativa	% aumento transcricional no grupo CsA	P
SDC-2	0,220 $\pm$ 0,045	0,083 $\pm$ 0,008	165	<0,0001
SDC-4	0,535 $\pm$ 0,152	0,131 $\pm$ 0,013	308	<0,0001
Betaglicam	0,882 $\pm$ 0,098	0,619 $\pm$ 0,100	42	<0,0001

5.3 A quantidade de GAGs sulfatados totais e relativos não diferiu entre os grupos

A figura 5.5 mostra os resultados das eletroforeses em gel de agarose 0,5% com as frações de GAGs sulfatados dispostas em bandas definidas. Na figura 5.6 observamos exemplos típicos de géis contendo amostras degradadas com as enzimas específicas para as famílias de GAGs sulfatados.

A tabela 5.3 relaciona os resultados densitométricos semiquantitativos dos GAGs totais e das 3 diferentes famílias de GAGs sulfatados (CS, DS e HS) nos dois grupos do estudo. A tabela 5.4 mostra a os resultados da dosagem de GAGs sulfatados totais pelo método do DMMB.

5.4 A imunolocalização do SDC-2 e do SDC-4 foi marcante nos componentes epitelial, conjuntivo, vascular e inflamatório dos dois grupos do estudo

As figuras 5.7 a 5.10 mostram a os resultados da análise imunohistoquímica do SDC-2 e do SDC-4, respectivamente, em ambos os grupos deste estudo.

Figura 5.5 – Eletroforese em géis de agarose dos GAGs extraídos de amostras do grupo CsA (A) e Ctr (B). P, mistura padrão contendo 5 μ g de condroitin sulfato (CS); 5 μ g de dermatan sulfato (DS) e 5 μ g de heparan sulfato (HS).

Figura 5.6 - Eletroforese em gel de agarose dos GAGs extraídos de amostras CsA e Ctr degradadas pelas enzimas: condroitinases (ABC e AC-II) e heparitinase (H-I); P = mistura padrão contendo 5 μ g de CS, condroitin sulfato; 5 μ g de DS, dermatan sulfato, 5 μ g de HS, heparan sulfato.

Tabela 5.3 - Densitometria dos GAGs gengivais. CsA, grupo ciclosporina-A; Ctr, grupo controle. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão das densidades relativas ao padrão de massa conhecida no mesmo gel da amostra. Os grupos foram comparados pelo teste *t* de Student (*P*); CS, condroitin sulfato; DS, dermatan sulfato; HS, heparan sulfato.

GAGs	Densidade relativa da CsA	Densidade relativa do Ctr	CsA/Ctr	<i>P</i>
Totais	8,64 $\pm$ 5,25	8,01 $\pm$ 1,30	8%	0,724
CS	1,98 $\pm$ 1,14	2,00 $\pm$ 0,36	-1%	0,962
DS	2,91 $\pm$ 1,88	2,96 $\pm$ 0,55	-2%	0,936
HS	3,18 $\pm$ 2,54	2,92 $\pm$ 0,63	9%	0,778

Tabela 5.4 - Valores dos GAGs gengivais totais obtidos pelo método do DMMB. CsA, grupo ciclosporina-A; Ctr, grupo controle. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão das densidades relativas ao padrão de massa conhecida no mesmo gel da amostra. Os grupos foram comparados pelo teste *t* de Student (*P*).

	Densidade relativa da CsA	Densidade relativa do Ctr	CsA/Ctr	<i>P</i>
GAGs total	0,39 $\pm$ 0,24	0,47 $\pm$ 0,20	-1700%	0,4216

Figura 5.7 - Imunohistoquímica do SDC-2 em amostra de paciente do Grupo Ctr. **A.** Nota-se a positividade de marcação do epitélio de revestimento, mais evidente nas camadas intermediárias e ausente na camada córnea. **B e C.** Destaque para o tecido conjuntivo com intenso infiltrado inflamatório plasmocitário característico de gengivite e positividade nos fibroblastos, células endoteliais, plasmócitos e linfócitos. **D.** Imunopositividade na matriz e em vasos sanguíneos. Em **E**, observa-se marcação positiva de células inflamatórias e de um nervo visto em corte transversal (seta).

Figura 5.8 - Imunohistoquímica do SDC-2. Crescimento gengival de um paciente do Grupo CsA. **A.** Note-se a positividade de marcação do epitélio de revestimento hiperplásico, da lâmina própria e vasos. **B.** Destaque para o epitélio, mostrando positividade mais intensa nas camadas basal e suprabasais e camada córnea negativa. **C.** A marcação é homogênea e difusa, porém exibe um padrão granular característico. **D.** Projeções epiteliais em “tubo de ensaio” e tecido conjuntivo inflamado, mostrando positividade de fibroblastos, células inflamatórias e dos domínios matriciais relacionados com o colágeno. **E.** Destaque para o tecido conjuntivo, com imunopositividade marcante em fibroblastos e células endoteliais. **F.** Área de denso infiltrado inflamatório, com marcação intensa de células inflamatórias, fibroblastos e vasos (seta); marcação mais intensa em áreas de colágeno mais frouxo, diferentemente das áreas que permeiam feixes mais hialinizados, com pouca marcação.

Figura 5.9a - Imunohistoquímica do SDC-4 em amostra gengival de um paciente do Grupo Ctr. Em A a C, note-se o padrão de marcação mais intenso na região da membrana basal, desenhando o contorno da célula. Em D e E, marcação positiva em fibroblastos, vasos sangüíneos na matriz, sendo que as áreas mais hialinizadas mostram-se negativas.

Figura 5.9b - Imunohistoquímica do SDC-4 em amostra de um paciente do Grupo Ctr, com ênfase para a componente nervoso e vascular. Em A, B e C, destaque para cortes longitudinal e transversais de nervos, com intensa imunopositividade (controle positivo interno à amostra). Em D, destaque para a marcação mais intensa do endotélio dos vasos.

Figura 5.10a - Imunohistoquímica do SDC-4. Crescimento gengival de um paciente do Grupo CsA. **A.** Nota-se a positividade de marcação do epitélio de revestimento hiperplásico em toda sua extensão com maior intensidade nas camadas superiores. **B.** Projeções epiteliais afiladas em meio a papilas conjuntivas com inflamação evidente. **C.** Denso infiltrado inflamatório subepitelial intensamente marcado. **D.** Tecido conjuntivo mostrando positividade mais intensa na matriz relacionada com colágeno de feixes finos ou dissociados, próximos à área inflamada.

Figura 5.10b - Imunohistoquímica do SDC-4 em amostra de um paciente do Grupo CsA. **A.** Nota-se a marcação homogênea do epitélio de revestimento e lâmina própria com infiltrado inflamatório imunopositivo. **B.** Papilas conjuntivas evidenciando células endoteliais e fibroblastos imunopositivos em meio à matriz hialinizada negativa. Em **C**, inflamação intensa e aparente positividade na fibrilas finas próximas à área inflamada, permeando os feixes de colágeno mais densos (seta).

6 DISCUSSÃO

Este trabalho dá continuidade à linha de pesquisa em que analisamos PGs de matriz extracelular no CG induzido pela CsA. Em nossos estudos anteriores, observamos que a expressão de mRNA para perlecan foi 54% maior no tecido gengival de indivíduos usuários de CsA, em comparação com indivíduos não expostos à medicação (GNOATTO et al., 2003). O perlecan é um importante sinalizador de funções metabólicas nas membranas basais subepiteliais e vasculares que influem na matriz extracelular como um todo. Por conter HS em sua estrutura, atribui-se a este PG grande afinidade por bFGF, funcionando como um grande regulador da angiogênese, entre outros fenômenos (RUOSLAHTI; YAMAGUCHI, 1991; WHITELOCK et al., 1996). O bFGF é apontado por Yoshida, Nagata e Yamane (2005) como um dos fatores de crescimento que aparentam estar aumentados no CG induzido por CsA, com base em suas observações em culturas de fibroblastos gengivais de rato estimuladas com o medicamento.

No presente trabalho avaliamos outros importantes PGHSs reguladores desse fator de crescimento, os SDCs, e o PGHS receptor de TGF- β , o betaglicam. Este último desperta especial interesse pelo fato do TGF- β ter mostrado expressão aumentada sob a ação da CsA (COTRIM et al., 2003). Não existe na literatura algum estudo que tenha avaliado PGHSs no CG induzido por CsA, nem mesmo na gengiva normal.

Shimazu et al. (1999) analisaram qualitativamente, por RT-PCR e *northern blotting*, o mRNA para SDC-2, SDC-4 e receptor FGFR1 de bFGF em culturas de

fibroblastos do ligamento periodontal, constatando sua expressão. Worapamorn et al. (2000a) identificaram a positividade de expressão de SDC-2, SDC-4, glipicam e betaglicam em 3 linhagens de células periodontais de ratos: fibroblastos gengivais, do ligamento periodontal e osteoblastos. Segundo os autores, a complexidade estrutural e a variedade de tipos celulares do periodonto obrigaram-nos a analisar a expressão do mRNA de maneira independente em linhagens isoladas. Cada tecido periodontal é peculiar em sua morfologia e funções, de modo que uma variedade de PGs são sintetizados e modulados num padrão correspondente à matriz de seu tecido de origem e à sua homeostase. Os papéis desempenhados por esses PGs nas interações célula-célula e célula-MEC permanecem pouco compreendidos.

Entre os resultados de nosso trabalho, observamos no grupo CsA uma maior transcrição de mRNA para os 3 PGs analisados, comparativamente ao grupo Ctr. Nossas análises transcricionais avaliaram o RNA total extraído do tecido gengival, de modo que vários tipos celulares do tecido conjuntivo e do epitélio foram testados em conjunto. Não há dúvidas de que esses tecidos se inter-relacionam, e que a expressão de PGs de um tipo celular pode influenciar a homeostase do periodonto como um conjunto. No CG induzido por CsA, a expressão expandida do componente vascular e as características do infiltrado inflamatório devem justificar, em parte, a maior expressão de SDCs e betaglicam nas amostras desse grupo.

O aumento observado na expressão dos SDCs no grupo CsA tem íntima relação com a expressão de bFGF e outros fatores de crescimento. Além disso, os SDCs promovem importantes sinalizações mitogênicas individualmente nos tecidos (WORAPAMORN et al., 2001b). Os SDCs modulam o fenótipo, a adesão, a proliferação, a diferenciação e a migração celulares. Podem agir como co-receptores,

não só intermediando a ligação, como também modificando a ação de vários fatores de crescimento e citocinas. Estudos da angiogênese já mostraram que o bFGF necessita não só seu receptor FGFR-1, mas também SDC-4 para agir na mitogênese mediada por trombina (RAUCH et al., 2005). Whitworth et al. (2005) observaram, nas vizinhanças de adenocarcinomas de ovário, a marcação de neoangiogênese ativa mediada por bFGF com a participação de SDC-3.

Os SDCs, na qualidade de PGHSs, funcionam como receptores de bFGF e outros fatores, como aFGF, GM-CSF, além das citocinas IL-3 e IFN- γ (RUOSLAHTI; YAMAGUCHI, 1991). Isto permite que a MEC funcione como um grande reservatório de estimuladores do crescimento tecidual. Estes fatores, por sua vez, participam de um conjunto de modulações da síntese de MEC. Em análise do comportamento de células do ligamento periodontal humano normal estimuladas por fatores de crescimento e citocinas, Worapamorn et al. (2001a) constataram que o mRNA para SDC-1 aumentava na presença de bFGF, enquanto nenhum outro SDC mostrou aumento de expressão sob esse estímulo.

Os complexos formados entre os PGHSs e outros fatores teciduais permanecem ativos até sua liberação ser promovida por enzimas como a plasmina, heparitinases e outras MMPs (SAKSELA; RIFKIN, 1990) salientar que existe uma convergência de informações na literatura indicando a aparente redução da expressão e da atividade de MMPs no CG induzido por CsA. A hipótese de que a provável sub-regulação produzida pela CsA na dinâmica de liberação dos complexos formados pelos SDCs, bem como pelo perlecan, com fatores de crescimento é um aspecto que merece especial atenção em futuros estudos. Um possível mecanismo a ser investigado é a expressão

aumentada de fatores de crescimento como uma resposta compensatória à atividade diminuída de MMPs na disponibilização dos fatores de crescimento.

A análise imunohistoquímica que realizamos não teve por finalidade uma avaliação comparativa entre os grupos do estudo, e sim confirmar a localização no tecido gengival do SDC-2 e do SDC-4, que mostraram expressão gênica aumenta no grupo CsA. Essas avaliações *in situ* fizeram parte de um estudo paralelo que realizamos da caracterização desses SDCs e de seus outros dois congêneres, SDC-1 e SDC-3, no tecido gengival normal e em nossa casuística do grupo CsA, uma vez que não encontramos na literatura outro estudo que caracterizasse esses compostos no tecido gengival humano. Estes achados são inéditos e é objetivo de nossas próximas investigações analisar semiquantitativamente a tradução dos SDCs em nossa casuística por esta metodologia.

Em nosso estudo piloto, testamos o anticorpo anti-perlecan humano com o objetivo de dar continuidade à caracterização desse PG iniciada previamente. O único anticorpo à nossa disposição no mercado não mostrou reatividade em nossos experimentos, apesar de longo período de padronizações de sua utilização. Os congêneres SDCs mostraram constante positividade em nossa casuística. Intensa imunolocalização pôde ser constatada nos tecidos epitelial, conjuntivo, endotelial e nervoso da gengiva, bem como no componente de células inflamatórias. A imunopositividade expressou-se tanto na superfície celular quanto no citoplasma e na MEC. A marcação foi homogênea e difusa, porém exibindo um padrão granular característico.

Sabemos que os SDCs têm ectodomínios com proporções preponderantes e com intensa relação com os componentes matriciais. Em ambos os grupos de nossa

casuística, estes compostos mostraram intensa marcação imunohistoquímica sobre o colágeno da MEC, principalmente onde o mesmo encontrava-se em dissociação ou com características de tecido conjuntivo frouxo. Nessas áreas, os fibroblastos exibiam maior imunopositividade, assim como o infiltrado de células inflamatórias. Os feixes colagênicos mais densos, no entanto, caracterizaram-se por aparente imunonegatividade em seu cerne.

Estas avaliações merecem continuidade mediante uma análise quantitativa e poderão corroborar com nossos achados da expressão dos genes analisados e esclarecer, em parte, a patogênese do CG induzido por CsA.

Entre nossas observações histológicas do tecido gengival afetado pela CsA, observamos epitélio acantótico. Projeções epiteliais em “tubo de ensaio” foram caracterizadas em diversos cortes, permeando o tecido conjuntivo inflamado, à semelhança do que já havia sido descrito por Niimi et al. (1990) e Pisanty et al. (1990). Entretanto, estes últimos autores não atribuíram a acantose a um processo hiperplásico, e sim a um aumento no ciclo de vida dos queratinócitos, com base em suas avaliações da expressão de DNA polimerase- α .

Um considerável infiltrado inflamatório subepitelial marcou nossa casuística. O grupo Ctr constitui-se de indivíduos em tratamento na clínica periodontal e que necessitavam cirurgia pré-protética. Apesar de subentender-se um aparente controle dos parâmetros clínicos inflamatórios nesta fase do tratamento, o infiltrado linfoplasmocitário pôde ser observado de maneira intensa em algumas amostras analisadas. Igualmente no grupo CsA, a inflamação foi muito evidente e com características semelhantes às do controle. O marcante acúmulo de colágeno diferenciou este grupo, cujo infiltrado

inflamatório ocorria em permeio aos densos feixes colagênicos. Estes feixes mostravam pouca ou nenhuma imunopositividade aos anti-sindecans nas áreas de maior densidade e maior imunopositividade nas áreas de dissociação em sua periferia, onde ocorria o direto relacionamento dos feixes com a MEC não colagênica.

É discutível afirmar que o infiltrado inflamatório subepitelial do grupo CsA seja devido unicamente à ação da placa bacteriana, como é de se inferir no grupo Ctr. Mesmo diante dos índices altos de placa entre os indivíduos com CG induzido por CsA antes dos procedimentos básicos periodontais, existe na literatura uma relação estabelecida entre o fármaco e o infiltrado inflamatório e até mesmo a hipótese de uma provável hipersensibilidade à CsA, pelo fato da interrupção da medicação ser suficiente para reverter o quadro de resposta celular (LAMBERTENGHI-DELILERS et al., 1986; MARIANI et al., 1993). Entretanto, essa relação necessita ainda intenso estudo.

Além dos SDCs, analisamos o mRNA de outro importante PG de superfície celular, o betaglicam (receptor de TGF- β 1 tipo III), e observamos que sua expressão foi maior no grupo CsA. Sabemos que o TGF- β sinaliza uma variedade de funções metabólicas já comentadas, mediante um receptor do tipo proteína quinase, e liga-se ao corpo protéico dos PGs decorim e betaglicam.

O decorim foi nosso objeto de estudo prévio juntamente outro pequeno PG rico em leucina, o biglicam. Decorim é um importante bloqueador de TGF- β , inibindo a proliferação celular (YAMAGUCHI et al., 2004) e a manifestação de lesões fibróticas (BORDER et al., 1992; ISAKA et al., 1996). Em sendo um importante reservatório de TGF- β , o decorim pode disponibilizá-lo em determinadas ocasiões, na dependência de mecanismos sinalizadores e da ação do biglicam, estimulante da fibrilogênese

(HILDEBRAND et al., 1994; KRESSE et al., 1994; TAKEUCHI; KODAMA; MATSUMOTO, 1994). O TGF- β , por sua vez, estimula a expressão tanto do decorim quanto do biglicam (HARDINGHAM; FOSANG, 1992). Em nossa investigação no CG induzido por CsA, observamos que o decorim e o biglicam não mostraram diferenças transcricionais em comparação com controles não afetados pela CsA (GNOATTO et al., 2003).

O betaglicam também regula o TGF- β , funcionando como apresentador do mesmo a seus receptores de sinalização, formando assim um composto ternário. É também capaz de eliminar diferenças entre suas isoformas (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3). Se por um lado aumenta a capacidade de ligação do TGF- β aos seus sítios, por outro o betaglicam compete pelos mesmos, na dependência de fatores moduladores (FUKUSHIMA et al., 1993). Além disso, liga-se ao bFGF por meio de suas cadeias de heparan sulfato. Atua, portanto, como um importante reservatório de fatores de crescimento e suas ações, em conjunto, potenciam a resposta celular aos mesmos (LOPEZ-CASILLAS; WRANA; MASSAGUE, 1993). Nenhum estudo havia avaliado até hoje este PG no tecido gengival alterado pela CsA. Estudos caracterizando o periodonto normal de ratos foram publicados previamente, porém relacionados ao periodonto de sustentação (GAO; SYMONS, BARTOLD, 1999). Este importante PG necessita intensa investigação a fim de que se compreenda melhor o mecanismo de ação do TGF- β e outros importantes fatores no CG induzido por CsA.

Nossa avaliação de GAGs teciduais não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos CsA e Ctr, tanto nos experimentos de dosagem quanto na análise densitométrica desses compostos nas eletroforeses. Nossos resultados somam-

se aos achados conflitantes da literatura. As publicações que descreveram o componente não colagênico da MEC no CG induzido por CsA contêm algumas controvérsias que podem ser justificadas pelo pequeno número de estudos, utilizando métodos cujas limitações dificultam correlações fiéis entre eles.

As diferenças entre os resultados produzidos *in vitro* já surgiu nas primeiras análises em cultivo celular, que despertaram para a consideração dos CGs medicamentosos como entidades distintas entre si. Na análise do crescimento gengival induzido pela fenitoína, Dahllof e Hjerpe (1987) e Suresh, Puvanakrishnan e Dhar (1992) relataram um aumento nos níveis de GAGs secretados por fibroblastos oriundos dessa lesão. Outros trabalhos observaram síntese de PGs tanto aumentada (MCKEVITT; IRWIN, 1995) quanto diminuída (TIPTON; FRY; DABBOUS, 1994) por fibroblastos gengivais estimulados com nifedipina.

Os poucos estudos que analisaram semiquantitativamente os GAGs no CG induzido por CsA têm casuística reduzida e resultados também divergentes. Rocha et al. (2000) analisaram bioquimicamente o tecido gengival de 4 indivíduos com CG induzido por CsA e não encontraram diferença em relação aos controles de gengiva normal. Em publicação mais recente da distribuição de peso molecular desses GAGs em amostras de 2 pacientes usuários de CsA, o mesmo grupo de autores não encontrou diferenças na comparação com o tecido gengival afetado por nifedipina ou gengiva normal (MARTINS et al., 2003).

Os demais estudos publicados analisaram a síntese de GAGs em culturas de fibroblastos oriundos do tecido gengival alterado pela CsA e também produziram conclusões divergentes. As primeiras análises não encontraram diferenças na síntese de GAGs em relação aos controles não afetados (BARBER; SAVAGE; SEYMOUR,

1992; BARTOLD, 1989) ou constataram um declínio relativo (WILLERSHAUSEN; LEMEN; SCHUMACHER, 1992), porém sucessivos estudos mostraram, ao contrário, aumento na síntese da matriz que contém esses compostos (MARIOTTI et al., 1998; NEWELL; IRWIN, 1997; STABELLINI et al., 2004; ZEBROWSKI et al., 1994).

Sabemos que os estudos *in vitro* com culturas apresentam limitações, tais como a análise de linhagens celulares isoladas, diferentemente da heterogeneidade de subpopulações existentes *in vivo*, que se inter-relacionam nas diferentes funções biológicas que desempenham. Além disso, a ausência nas culturas de uma matriz extracelular que reproduza o complexo microambiente tecidual, com sua diversidade de fatores de crescimento, citocinas e demais fatores inflamatórios, bem como as toxinas bacterianas do sulco gengival, dificulta a interpretação de seus resultados e extrapolações clínicas. A forte influência de fatores como a densidade e a confluência celular e o prazo de cultivo também deve ser considerada, uma vez que já se mostrou responsável por resultados opostos dentro do mesmo estudo (NEWELL; IRWIN, 1997). A susceptibilidade genética inerente à linhagem do fibroblasto talvez possa justificar a diferença entre esses resultados.

Utilizamos na análise dos GAGs teciduais duas diferentes metodologias: dosagem por espectrofotometria e eletroforese seguida de densitometria. Nossa casuística (30 indivíduos, 15 de cada grupo) foi bastante significativa, quando considerada a dificuldade de obtenção de uma amostra homogênea e seleta perante todos os critérios de exclusão. A maneira com que nossos resultados se reproduziram entre as repetições dos experimentos, bem como a constatação da ausência de diferenças não só na proporção de GAGs sulfatados totais na gengiva, como também

entre as suas 3 famílias, levam-nos a corroborar com a hipótese de que não ocorre acúmulo absoluto de GAGs sulfatados no tecido afetado pela CsA.

Acreditamos que a expressão gênica aumentada dos PGs que observamos no grupo CsA seja acompanhada de mecanismos moduladores de sua tradução. A literatura atual é incapaz de respaldar a real constituição do tecido gengival destes indivíduos ou de caracterizar uma maior proporção de PGs *in situ*. Apenas 3 entre as investigações relatadas analisaram a matriz extracelular em seu componente de GAG não sulfatado, o ácido hialurônico. Rocha et al. (2000), em sua casuística limitada a 4 amostras gengivais, não verificaram desvio da normalidade. Os estudos de Newell e Irwin (1997) e Zebrowski et al. (1994) avaliaram a biossíntese de GAGs com glicosamina triciada, uma vez que a glicosamina compõe pelo menos 50% da molécula do ácido hialurônico. O primeiro constatou aumento deste GAG nas culturas estimuladas com CsA, enquanto o segundo verificou inalteração do mesmo em culturas confluentes e sua redução em culturas de baixa densidade celular. Estes dados fazem oposição aos resultados de análise similar no CG induzido por fenitoína, onde se observaram níveis aumentados de ácido hialurônico (SURESH; PUVANAKRISHNAN; DHAR, 1992).

Reservadas as controvérsias como sendo inerentes às limitações dos diferentes estudos, é possível que o aumento da matriz não colagênica no CG induzido por CsA esteja traduzido, em parte, pelo acúmulo de ácido hialurônico, entre outras substâncias. Entre algumas consequências clínicas, haveria aumento da pressão coloidosmótica, retenção hídrica e edema. A matriz expandida e hidratada facilitaria a migração celular e a evolução da lesão, à semelhança do que ocorre na morfogênese e na reparação

(LAURENT; FRASER, 1986). Esta hipótese é partilhada por Stabellini et al. (2004) e necessita ainda ser testada por diferentes metodologias até sua confirmação.

É importante considerarmos que os fenômenos biológicos *in vivo* envolvem inimagináveis mecanismos de sinalizações e retroações que ainda necessitam ser investigados. As células estão expostas às diversas citocinas e fatores de crescimento de maneira combinada e em eventos seqüenciais. Também acredita-se que cada gene tenha seu tempo característico de indução a partir da exposição da célula aos seus estimulantes biológicos (WORAPAMORN et al., 2001b) e, sob esse raciocínio, toda lesão poderia ser vista dentro de uma análise fragmentária de um determinado momento do fenômeno, ou ainda um momento da indução de resposta.

Os PGs estudados sofrem extensa modulação durante a expressão celular. Alterações protéicas e, principalmente, variações estruturais nas cadeias de GAGs são eventos comuns. Essas variações ocorrem com maior frequência no número de cadeias, em seu comprimento e no padrão de sulfatação, e resultam em transformações no tipo e na função do PG. Por outro lado, o controle dessas estruturas também existe, mediante mecanismos ainda pouco compreendidos, entretanto as necessidades biológicas de momentos distintos serão determinantes da adequação do PG a uma ou outra forma ou propriedade (HARDINGHAM; FOSANG, 1992).

É importante ressaltar que toda investigação tem sua credibilidade testada por parâmetros que quase sempre relacionam o tamanho da amostra e os limites de execução. Nosso trabalho, assim como a maioria das investigações analisadas na literatura, tiveram como objeto de estudo seres humanos submetidos a transplantes de órgãos, imunossuprimidos e com qualidade de vida severamente comprometida. A intenção da pesquisa médica é trabalhar em prol da melhoria dessas condições, porém

dentro dos limites clínicos. A obtenção de amostras gengivais destes pacientes nem sempre garante material biológico suficiente para análises tão extensivas quanto as idealizadas mediante diferentes metodologias. Essa dicotomia certamente é uma das justificativas para o fato da maioria da literatura revisada possuir casuística limitada a menos de 5 amostras. Seus resultados, no entanto, subsidiam o paradigma atualmente proposto da patogênese do CG induzido pela CsA.

Nossa casuística é maior que a que compõe a maioria dos estudos analisados. Entretanto, nossa linha de pesquisa previa, desde o início, a avaliação da transcrição gênica paralelamente à análise bioquímica dos tecidos e à análise imunohistoquímica de cortes histológicos. Tal projeto obrigou-nos a distribuir o escasso material clínico obtido, principalmente do grupo controle, de maneira a viabilizá-lo. A composição de amostras reunidas na forma de *pools* foi a solução encontrada para os ensaios de expressão de mRNA, que representavam uma ameaça de extinção do material já na fase de padronização das reações e validação técnica.

A homogeneidade observada nos produtos de PCR qualitativa e a reprodutibilidade observada rotineiramente nas quintuplicatas de amplificações gênicas foram requisitos determinantes na escolha de nossa metodologia. Esta difere de nosso trabalho prévio, em que a expressão gênica foi analisada em amostras individuais, porém não deixando de ser confiável e representativa do padrão de expressão médio da população analisada, na qual tem seu devido valor a variabilidade intra-específica.

Infelizmente, ainda não estamos no tempo de discutir formas alternativas ao tratamento periodontal convencional dos crescimentos gengivais com propriedade, entretanto algumas perspectivas terapêuticas do CG induzido por CsA estão surgindo, com base nos estudos mais recentes da MEC.

Nossos achados, deparados com a literatura atual, levam-nos a acreditar que a modulação terapêutica efetiva do CG induzido por CsA esteja vinculada ao controle da ação de fatores de crescimento. Comentamos anteriormente que os SDCs têm íntima relação com o bFGF em suas funções. O bFGF, por sua vez, necessita a presença de HS para a ligação ao seu receptor. Yayon et al. (1991) verificaram em experimento com células de hamsters que o receptor de bFGF mostrava baixa afinidade pelo fator de crescimento, porém na presença de HS adicionado essa afinidade era alta. O estudo do controle deste composto *in loco* pode representar uma possibilidade de tratamento do CG.

Qiao et al. (2003) observaram, em um estudo imunohistoquímico do tecido nervoso central, a necessidade de HS para que o bFGF estimulasse a proliferação das células endoteliais, e atribuíram às cadeias de HS do SDC-2 e do SDC-4 a capacidade de formação de complexos ternários entre as células endoteliais, o bFGF e seu receptor FGFR1c. Estas informações nos chamam a atenção à investigação de mecanismos análogos no tecido gengival, bem como de modulações do SDC-2 e do SDC-4, que mostraram expressão aumentada em nosso estudo.

Rapraeger, Krufka e Olwin (1991) constataram que o bloqueio das ligações entre os PGHSs e bFGF reduz a ligação do fator de crescimento ao seu receptor, bloqueia suas ações em fibroblastos da linhagem Swiss 3T3 e induz diferenciações celulares normalmente reprimidas por ele. Na pesquisa médica, uma abordagem como essa foi recentemente apontada por Whitworth et al. (2005) como perspectiva terapêutica do adenocarcinoma de ovário e pode ter potencial similar no tratamento local do CG induzido por CsA. Os autores investigaram a distribuição de uma sonda marcadora de HS ativo (receptor FGFR1c, isoforma III), que ocorreu em sítios vizinhos ao tumor,

indicando a sinalização de angiogênese nas porções basais do endotélio, onde também evidenciou-se a participação de SDC-3. Em teoria, o bloqueio desses sítios pode representar uma possibilidade de tratamento dos crescimentos tumorais.

O tratamento do CG induzido por CsA de forma local ainda não foi descoberto, mas pode estar próximo. A pesquisa de terapias que modulam a ação de fatores de crescimento tem avançado e permitido o desenvolvimento de abordagens locais. Um exemplo são os polímeros injetáveis de liberação lenta de GAGs (hidrogéis) desenvolvidos por Cai et al. (2005), que mimetizam uma MEC com fatores indutores. Distintamente indicados com o propósito de fornecer bFGF e permitir a neovascularização em tecidos, estas descobertas podem representar o caminho para a pesquisa de dispositivos com fatores que promovam o bloqueio do fator de crescimento, uma vez que os hidrogéis de polietilenoglicol-diacrilato foram constituídos de uma combinação de heparan sulfato análogo à heparina, condroitin sulfato ou ácido hialurônico. A grande capacidade destes compostos, principalmente o HS, formarem ligações cruzadas com fatores de crescimentos e seus receptores nos desperta para o estudo de abordagens inibidoras do crescimento por dispositivos de matriz reconstituída semelhantes ao exemplificado.

Assim, uma terapia local promovendo o impedimento das ligações dos complexos ternários entre HSPGs e o bFGF, ou outros fatores, pode representar uma perspectiva terapêutica do CG e de muitas outras lesões com processos angiogênicos, como os carcinomas.

Os numerosos efeitos colaterais do tratamento com CsA constantemente preocupam os clínicos e impulsionam a pesquisa por tratamentos menos deletérios. Entretanto, até o presente momento, sua substituição por agentes alternativos é uma

conduta terapêutica praticada em menor extensão que o esperado. A substância mais investigada como alternativa ao uso da CsA tem sido o FK506 (tacrolimus), com mecanismo de ação semelhante, por inibição da calcineurina. Todavia, além de ser menos eficaz na imunossupressão que a CsA, este agente apresentou potencial carcinogênico aparentemente maior *in vitro* (NISHIGAKI et al., 2002). São necessários estudos mais aprofundados que elucidem o atual dilema. A CsA é ainda considerada o imunossupressor de primeira escolha devido à sua eficácia e sucesso na sobrevida de seus usuários. Com isso, a busca por terapias do CG induzido pela CsA tem pela frente muita investigação.

Qualquer modalidade de tratamento dos efeitos colaterais da CsA representa um desafio à pesquisa, não só de sua eficácia clínica, mas principalmente no que antecede sua aplicação, em ensaios *in vitro*, estudos experimentais em animais e finalmente nos aspectos farmacodinâmicos *in vivo*, pois deve-se evitar toda e qualquer interferência negativa no tratamento de imunossupressão. Ironicamente, as terapias estudadas até o presente momento para o CG induzido pelo fármaco são sistêmicas, partiram de casualidades clínicas e sua aplicação iniciou-se de maneira bastante empírica.

Na clínica de transplantes de órgãos e tecidos, não é raro observarmos a resolução temporária do CG induzido por CsA após o tratamento com o antibiótico azitromicina (PAIK et al., 2004; PUIG et al., 1997; WIRNSBERGER et al., 1998). Em meio à insuficiência de informações que justifiquem sua utilização com essa finalidade, este azalídeo tem mostrado a propriedade de melhorar a condição clínica em determinados casos e, ao que tudo indica, em indivíduos susceptíveis a essa reação.

Permanece em dúvida o mecanismo de ação da azitromicina, interagindo com as células e/ou competindo com a CsA. Acredita-se que este azalídeo tanto possa agir

como modulador de síntese de MMPs e outros fatores por fibroblastos, macrófagos e PMNs (VAN BAMBEKE et al., 1998), quanto no controle da etiologia bacteriana (SEFTON et al., 1996), diminuindo, assim, um dos fatores de desequilíbrio no balanço entre agressor e resposta do hospedeiro.

A ação antagônica da azitromicina nessa expressão também pode residir no eficiente controle da agressão bacteriana, promovido pela absorção e distribuição deste antibiótico no alvo infeccioso por células fagocitárias (GLADUE et al., 1989). Os fibroblastos gengivais podem desempenhar um papel complexo na presença da azitromicina. Por um lado, absorvem grande parte desse fármaco e funcionam como reservatórios para a futura transferência do mesmo às células fagocitárias (GLADUE; SNIDER, 1990); por outro, poderiam ser metabolicamente modulados de modo a normalizarem a secreção de MMPs e outras biomoléculas da matriz (PAIK et al., 2004; VAN BAMBEKE et al., 1998).

Recentemente, Maita, Sato e Yamaki (2004) analisaram *in vitro* os efeitos do ácido antranílico (T1048, tranilast), um anti-histamínico e inibidor de angiogênese, em culturas de fibroblastos do CG induzido por CsA, bem como de gengiva normal e afetada pela periodontite. Os autores constataram que o ácido antranílico, em doses baixas, produziu nas culturas um aumento em 2 vezes na concentração de MMP-1. Enquanto as ações da CsA, da fenitoína e da nifedipina diminuíram a secreção de MMP-1 nas culturas, o ácido antranílico recuperou seus níveis aos valores iniciais. Os autores também constataram que o estímulo com ácido antranílico na concentração de 30mM produziu uma inibição na secreção de TGF- β . Sabemos que este fator de crescimento está envolvido em processos fibróticos, entre eles o CG. Apesar do

mecanismo de ação pouco elucidado, o ácido antranílico vem sendo usado na clínica médica no tratamento de doenças granulomatosas e proliferativas, como quelóides e cicatrizes hipertróficas. Entre suas ações, inibe a proliferação e a síntese de colágeno pelos fibroblastos, bem como a secreção de histamina pelos mastócitos e as substâncias reativas oxigenadas pelos PMNs (SUZAWA et al., 1992; YOUNG III et al., 2001).

É necessário que se conduza investigação mais aprofundada do antagonismo do ácido antranílico no CG, bem como da azitromicina e outros azalídeos, o que poderá auxiliar na melhor compreensão da sua etiopatogenia, e até mesmo na reavaliação do papel da placa bacteriana em seu processo. Terapias com enfoque no bloqueio local de fatores de crescimento e PGHSs também necessitam estudo.

Nossos achados corroboram com o atual conhecimento do CG induzido pela CsA, trazendo novos indícios de que sua MEC não colagênica é sede de importantes sinalizações envolvendo fatores de crescimento, GAGs, PGs e fatores inflamatórios. Na medida em que essas vias venham a ser elucidadas, poderemos estabelecer melhor a patogênese deste CG e aprimorar seu tratamento.

7 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitiram-nos concluir que:

1. O tecido gengival alterado pela CsA manifestou maior expressão de SDC-2, SDC-4 e betaglicam em comparação com a gengiva de indivíduos não expostos ao medicamento;
2. Os SDCs de expressão gênica aumentada no grupo CsA foram detectados *in situ*, com imunolocalização nos tecidos epitelial, conjuntivo, endotelial, nervoso e no infiltrado inflamatório, em todas as amostras gengivais analisadas.
3. Os resultados deste estudo corroboram com a hipótese de que o CG induzido por CsA não apresenta aumento absoluto ou relativo no componente de GAGs sulfatados.
4. Nossos achados complementam o conhecimento atual com novos indícios de que a MEC não colagênica tem um papel de destaque em importantes sinalizações envolvendo fatores de crescimento, GAGs, HSPGs e fatores inflamatórios no CG induzido pela CsA.

REFERÊNCIAS¹

Aas E. Hyperplasia gingivae diphenylhydantoinea: a clinical histological and biochemical study. *Acta Odontol Scand* 1963;21 Suppl 34:1-142.

Atilla G, Kütükçüler N. Crevicular fluid interleukin-1beta tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 levels in renal transplant patients receiving cyclosporine A. *J Periodontol* 1998;69(7):784-90.

Barber MT, Savage NW, Seymour GJ. The effect of cyclosporin and lipopolysaccharide on fibroblasts: implications for cyclosporin-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 1992;63(5):397-404.

Bar-Shavit R, Eskohjido Y, Fenton JW 2nd, Esko JD, Vlodavsky I. Thrombin adhesive properties: induction by plasmin and heparan sulfate. *J Cell Biol* 1993;123(5):1279-87.

Bartold PM. Proteoglycans of the periodontium: structure role and function. *J Periodontal Res* 1987;22(6):431-44.

Bartold PM. Regulation of human gingival fibroblast growth and synthetic activity by cyclosporine-A in vitro. *J Periodontal Res* 1989;24(5):314-21.

Bartold PM. Turnover in periodontal connective tissues: dynamic homeostasis of cells collagen and ground substances. *Oral Dis* 1995;1(4):238-53.

Berglundh T, Lindhe J, Tarkowski A. Effects of cyclosporine A on plasma cells in experimental gingivitis in dogs. *J Clin Periodontol* 1996;23(6):507-11.

Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, et al. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*. 1992;8:365-93.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, Decarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4(2):197-250.

¹ De acordo com Estilo Vancouver – Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

- Bonnaure-Mallet M, Tricot-Doleux S, Godeau GJ. Changes in extracellular matrix macromolecules in human gingiva after treatment with drugs inducing gingival overgrowth. *Arch Oral Biol* 1995;40(5):393-400.
- Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi YU, Mann DM, et al. Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 1992;346(6402):381-4.
- Buduneli E, Genel F, Atilla G, Kutukculer N. Evaluation of p53, bcl-2, and interleukin-15 levels in gingival crevicular fluid of cyclosporin A-treated patients. *J Periodontol* 2003;74(4):506-11.
- Buduneli N, Kütükçüler N, Aksu G, Atilla G. Evaluation of transforming growth factor-beta 1 level in crevicular fluid of cyclosporin A-treated patients. *J Periodontol* 2001;72(4):526-531.
- Bulfone-Paus S, Ungureanu D, Pohl T, Lindner G, Paus R, Ruckert R, et al. Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nat Med* 1997;3(10):1124-8.
- Cai S, Liu Y, Zheng Shu X, Prestwich GD. Injectable glycosaminoglycan hydrogels for controlled release of human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* 2005;26(30):6054-67.
- Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, et al. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys 2 pancreases and 2 livers. *Lancet* 1979;2(8151):1033-6.
- Carney SL, Muir H. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Physiol Rev* 1988;68(3):858-910.
- Carranza Junior FA, Newman MG. *Clinical periodontology*. 8a. ed. Philadelphia: Saunders; 1996.
- Cheifetz S, Massague J. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor proteoglycan. Cell surface expression and ligand binding in the absence of glycosaminoglycan chains. *J Biol Chem* 1989;264(20):12025-8.
- Chernousov MA, Carey DJ. N-syndecan (syndecan 3) from neonatal rat brain binds basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 1993;268(22):16810-4.

Ciarmela P, Florio P, Toti P, Grasso D, Santopietro R, Tosi P, et al. Expression of betaglycan in pregnant tissues throughout gestation. *Eur J Endocrinol* 2003;149(5):433-7.

Coley C, Jarvis K, Hassell T. Effects of cyclosporin-A on human gingival fibroblasts in vitro [abstr IADR 1658]. *J Dent Res* 1986;65 Supl:353.

Colvard MD, Bishop J, Weissman D, Gargiulo A. Cardizem induced gingival hyperplasia: a report of two cases. *Periodontal Case Rep* 1986;8(2):67-8.

Cotrim P, Martelli-Junior H, Graner E, Sauk JJ, Coletta RD. Cyclosporin A induces proliferation in human gingival fibroblasts via induction of transforming growth factor-beta1. *J Periodontol* 2003;74(11):1625-33.

Dahllof G, Hjerpe A. Synthesis of sulfated glycosaminoglycans by human gingival fibroblasts from phenytoin-induced gingival overgrowth in vitro. *Scand J Dent Res* 1987;95(3):250-5.

Daley TD, Wysocki GP, Day C. Clinical and pharmacologic correlations in cyclosporine-induced gingival hyperplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986; 62(4):417-21.

Das SJ, Newman HN, Olsen I. Keratinocyte growth factor receptor is up-regulated in cyclosporin A-induced gingival hyperplasia. *J Dent Res* 2002;81(10):683-7.

Das SJ, Parkar MH, Olsen I. Upregulation of keratinocyte growth factor in cyclosporin A-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 2001;72(6):745-52.

David-Neto E, Lemos FB, Furusawa EA, Schwartzman BS, Cavalcante JS, Yagyu EM, et al. Impact of cyclosporin A pharmacokinetics on the presence of side effects in pediatric renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(2):343-9.

Dawson J, Hurtenbach U, Mackenzie A. Cyclosporin A inhibits the in vivo production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha but not interleukin-6 by a T-cell-independent mechanism. *Cytokine* 1996;8(12):882-8.

De Camargo PM. Cyclosporin – and nifedipine – induced gingival enlargement: an overview. *J West Soc Periodontol Periodontal Abstr* 1989;37(2):57-64.

Ellis JS, Seymour RA, Thomason JM, Butler TJ, Idle JR. Periodontal variables affecting nifedipine sequestration in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res* 1995;30(4):272-6.

Emmel EA, Verweij CL, Durand DB, Higgins KM, Lacy E, Crabtree GR. Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation. *Science* 1989;22(4937):1617-20.

Esterberg HL, White PH. Sodium dilantin gingival hyperplasia. *J Am Dent Assoc* 1945;32:16-24.

Fan X-F, Scott PG. Cyclosporine effects on gingival fibroblasts in vitro. [abstr IADR 854]. *J Dent Res* 1989;68 Supl:288.

Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 1986;883(2):173-7.

Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR. Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 1991;352(6338):803-7.

Fukushima D, Butzow R, Hildebrand A, Ruoslahti E. Localization of transforming growth factor beta binding site in betaglycan. Comparison with small extracellular matrix proteoglycans. *J Biol Chem* 1993;268(30):22710-5.

Gao J, Symons AL, Bartold PM. Expression of transforming growth factor-beta receptors types II and III within various cells in the rat periodontium. *J Periodontal Res* 1999;34(2):113-22.

Gelfand EW, Cheung RK, Mills GB. The cyclosporins inhibit lymphocyte activation at more than one site. *J Immunol* 1987;138(4):1115-20.

Giannopoulou C, Cimasoni G. Functional characteristics of gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Dent Res* 1996;75(3):895-902.

Giustiniani S, Cuna Robustelli F, Marieni M. Hyperplastic gingivitis during diltiazem therapy. *Int J Cardiol* 1987;15(2):247-9.

Gladue RP, Snider ME. Intracellular accumulation of azithromycin by cultured human fibroblasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34(6):1056-60.

Gladue RP, Bright GM, Isaacson RE, Newborg MF. In vitro and in vivo uptake of azithromycin (CP-62 993) by phagocytic cells: possible mechanism of delivery and release at sites of infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33(3):277-82.

Gnoatto N, Lotufo RF, Toffoletto O, Marquezini MV. Gene expression of extracellular matrix proteoglycans in human cyclosporin-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 2003;74(12):1747-53.

Haase HR, Clarkson RW, Waters MJ, Bartold PM. Growth factor modulation of mitogenic responses and proteoglycan synthesis by human periodontal fibroblasts. *J Cell Physiol* 1998;174(3):353-61.

Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 1992;6(3):861-70.

Hardingham T, Heng BC, Gribbon P. New approaches to the investigation of hyaluronan networks. *Biochem Soc Trans* 1999;27(2):124-7.

Hassell TM. Evidence for the production of unactive collagenase by fibroblasts from phenytoin-enlarged human gingiva. *J Oral Pathol* 1982;11(4):310-7.

Hassell TM. Evidence for the production of unactive collagenase by fibroblasts from phenytoin-enlarged human gingiva. *J Oral Pathol* 1982;11(4):310-7.

Hassell TM, Stanek EJ. Evidence that healthy human gingiva contains functionally heterogeneous fibroblast subpopulations. *Arch Oral Biol* 1983;28(7):617-25.

Hefti AF, Eshenaur AE, Hassell TM, Stone C. Gingival overgrowth in cyclosporine A treated multiple sclerosis patients. *J Periodontol* 1994;65(8):744-9.

Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, et al. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J* 1994;302 (pt. 2):527-34.

Hodges NJ, Chipman JK. Down-regulation of the DNA-repair endonuclease 8-oxo-guanine DNA glycosylase 1 (hOGG1) by sodium dichromate in cultured human A549 lung carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2002;23(1):55-60.

Hong HH, Trackman PC. Cytokine regulation of gingival fibroblast lysyl oxidase, collagen, and elastin. *J Periodontol* 2002;73(2):145-52.

Hyland PL, McKeown ST, Mackenzie IC, Irwin CR. Regulation of keratinocyte growth factor and scatter factor in cyclosporin-induced gingival overgrowth. *J Oral Pathol Med* 2004;33(7):391-7.

Inagaki-Ohara K, Nishimura H, Mitani A, Yoshikai Y. Interleukin-15 preferentially promotes the growth of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing gamma delta T cell receptor in mice. *Eur J Immunol* 1997;27(11):2885-91.

Iozzo R.;Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 1998;67:609-652.

Isaka Y, Brees DK, Ikegaya K, Kaneda Y, Imai E, Noble NA, et al. Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. *Nat Med* 1996;2(4):418-23.

James JA, Irwin CR, Linden GJ. The effects of culture environment on the response of human gingival fibroblasts to cyclosporin A. *J Periodontol* 1995;66(5):339-44.

James JA, Irwin CR, Linden GJ. Gingival fibroblast response to cyclosporin A and transforming growth factor beta 1. *J Periodontal Res* 1998;33(1):40-8.

Kähäri;M, Larjava H, Uitto J. Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates biglycan (PGI) and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 1991;266(16):10608-15.

Kaneider NC, Reinisch CM, Dunzendorfer S, Romisch J, Wiedermann CJ. Syndecan-4 mediates antithrombin-induced chemotaxis of human peripheral blood lymphocytes and monocytes. *J Cell Sci* 2002;115(pt. 1):227-36.

Kardachi BJ, Newcomb GM. A clinical study of gingival inflammation in renal transplant recipients taking immunosuppressive drugs. *J Periodontol* 1978;49(6):307-9.

Kimball OP. The treatment of epilepsy with sodium diphenyl hydantoinate. *J Am Med Assoc* 1939;112(13):1244-5.

King GN, Fullinfaw R, Higgins TJ, Walker RG, Francis DM, Wiesenfeld D. Gingival hyperplasia in renal allograft recipients receiving cyclosporin-A and calcium antagonists. *J Clin Periodontol* 1993;20(4):286-93.

Knox S, Fosang AJ, Last K, Melrose J, Whitelock J. Perlecan from human epithelial cells is a hybrid heparan/chondroitin/keratan sulfate proteoglycan. *FEBS Lett* 2005;579(22):5019-23.

Kresse H, Hausser H, Schonherr E, Bittner K. Biosynthesis and interactions of small chondroitin/dermatan sulphate proteoglycans. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994;32(4):259-64.

Lambertenghi-Deliliers GL, Santoro F, Polli N, Bruno E, Fumagalli L, Risciotti E. Light and electron microscopic study of cyclosporin A-induced gingival hyperplasia. *J Periodontol* 1986;57(12):771-5.

Larjava H, Hakkinen L, Rahemtulla F. A biochemical analysis of human periodontal tissue proteoglycans. *Biochem J* 1992;284 (pt. 1):267-74.

Laurent TC, Fraser JR. The properties and turnover of hyaluronan. *Ciba Found Symp* 1986;124:9-29.

Lederman D, Lumerman H, Reuben S, Freedman PD. Gingival hyperplasia associated with nifedipine therapy: report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984;57(6):620-2.

Linden GJ, Haworth SE, Maxwell AP, Poulton KV, Dyer PA, Middleton D et al. The influence of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms on the severity of gingival overgrowth associated with concomitant use of cyclosporin A and a calcium channel blocker. *J Periodontol* 2001;72(6):808-14.

Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 1993;73(7):1435-44.

Lucas RM, Howell LP, Wall BA. Nifedipine-induced gingival hyperplasia: a histochemical and ultrastructural study. human gingiva. J Periodontol 1996;56:211-15.

McCulloch CAG, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. J Periodontal Res 1991;26:3(pt. 1):144-54.

McGaw T, Lam S, Coates J. Cyclosporin-induced gingival overgrowth: correlation with dental plaque scores gingivitis scores and cyclosporin levels in serum and saliva. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1987;64(3):293-7.

McGaw T, Porter H. Cyclosporine-induced gingival overgrowth: an ultrastructural stereologic study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1988;65(2):186-90.

McKevitt KMB, Irwin CR. Phenotypic differences in growth matrix synthesis and response to nifedipine between fibroblasts derived from clinically healthy and overgrown gingival tissue J Oral Pathol Med 1995;24(2):66-71.

Maita E, Sato M, Yamaki K. Effect of tranilast on matrix metalloproteinase-1 secretion from human gingival fibroblasts in vitro. J Periodontol 2004;75(8):1054-60.

Mariani G, Calastrini C, Aleotti A, Carnevale E, Stabellini G. Ultrastructural changes in Langerhans cells in gingival overgrowth in cyclosporin A-treated renal transplant patients. Pathology 2004;36(3):242-6.

Mariani G, Calastrini C, Carinci F, Marzola R, Calura G. Ultrastructural features of cyclosporine A-induced gingival hyperplasia. J Periodontol 1993;64(11):1092-7.

Mariani G, Calastrini C, Carinci F, Bergamini L, Calastrini F, Stabellini G. Ultrastructural and histochemical features of the ground substance in cyclosporin A-induced gingival overgrowth. J Periodontol 1996;67(1):21-7.

Mariotti A, Hassel T, Jacobs D, Manning CJ, Hefti AF. Cyclosporin A and hydroxycyclosporine (M-17) affect the secretory phenotype of human gingival fibroblasts. J Oral Pathol Med 1998;27(6):260-6.

Martins RC, Werneck CC, Rocha LA, Feres-Filho EJ, Silva LC. Molecular size distribution analysis of human gingival glycosaminoglycans in cyclosporin- and nifedipine-induced overgrowths. J Periodontal Res 2003;38(2):182-9.

Moder T, Wondimu B, Larsson E, Jonzon B. Levels of cyclosporin-A (CsA) in saliva in children after oral administration of the drug in mixture or in capsule form. *Scand J Dent Res* 1992;100(6):366-70.

Mohan PS, Spiro RG. Characterization of heparan sulfate proteoglycan from calf lens capsule and proteoglycans synthesized by cultured lens epithelial cells. Comparison with other basement membrane proteoglycans. *J Biol Chem* 1991;266(13):8567-75.

Morton RS, Dongari-Bagtzoglou AI. Regulation of gingival fibroblast interleukin-6 secretion by cyclosporine A. *J Periodontol* 1999;70(12):1464-71.

Myrillas TT, Kinden GJ, Marley JJ, Irwin CR. Cyclosporin A regulates interleukin-1beta and interleukin-6 expression in gingiva: implications for gingival overgrowth. *J Periodontol* 1999;70(3):294-300.

Nares S, Ng MC, Dill RE, Park B, Cutler CW, Iacopino AM. Cyclosporine A upregulates platelet-derived growth factor B chain in hyperplastic human gingiva. *J Periodontol* 1996;67(3):271-8.

Newell J, Irwin CR. Comparative effects of cyclosporin on glycosaminoglycan synthesis by gingival fibroblasts. *J Periodontol* 1997;68(5):443-7.

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

Nishigaki F, Sakuma S, Ogawa T, Miyata S, Ohkubo T, Goto T. FK506 induces chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic carcinoma cells, ATDC5. *Eur J Pharmacol*. 2002;437(3):123-8.

O'Valle F, Mesa FL, Gomez-Morales M, Aguilar D, Caracuel MD, Medina-Cano MT, et al. Immunohistochemical study of 30 cases of cyclosporin A-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 1994;65(7):724-30.

Paik JW, Kim CS, Cho KS, Chai JK, Kim CK, Choi SH. Inhibition of cyclosporin A-induced gingival overgrowth by azithromycin through phagocytosis: an in vivo and in vitro study. *J Periodontol* 2004;75(3):380-7.

Pernu HE, Pernu LMH, Knuuttila MLE, Huttunen KRH. Gingival overgrowth among renal transplant recipients and uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant* 1993;8(11):1254-8.

Pisanty S, Rahamim E, Ben-Ezra D, Shoshan S. Prolonged systemic administration of cyclosporin A affects gingival epithelium. *J Periodontol* 1990;61(2):138-41.

Poole AR. Proteoglycans in health and disease: structures and functions. *Biochem J* 1986;236(1):1-14.

Powles RL, Clink HM, Spence D, Morgenstern G, Watson JG, Selby PJ, et al. Cyclosporin-A to prevent graft-versus-host disease in man after allogeneic bone-marrow transplantation. *Lancet* 1980;1(8164):327-9.

Puig JM, Lloveras JM, Munné A, Mir M, Barbosa F, Masramon J. Treatment of gingival hyperplasia secondary to cyclosporine by the new macrolide azithromycin. *Transplant Proc* 1997;29(5):2379-80.

Pustiglioni NA. Avaliação clínica periodontal de pacientes transplantados renais submetidos a terapia imunossupressora. [Dissertação de Mestrado] São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2001.

Qiao D, Meyer K, Mundhenke C, Drew SA, Friedl A. Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 signaling in brain endothelial cells. Specific role for glypican-1 in glioma angiogenesis. *J Biol Chem* 2003;278(18):16045-53.

Ramon Y, Behar S, Kishon Y, Engelberg IS. Gingival caused by nifedipine: a preliminary report. *Int J Cardiol* 1984;5(2):195-204.

Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 1991; 252(5013):1705-8.

Rateitschak-Plüss EM, Hefti A, Lörtscher R, Thiel G. Initial observation that cyclosporin-A induces gingival enlargement in man. *J Clin Periodontol* 1983;10(3):237-46.

Rauch BH, Millette E, Kenagy RD, Daum G, Fischer JW, Clowes AW. Syndecan-4 is required for thrombin-induced migration and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005;280(17):17507-11.

Redlich M, Greenfeld Z, Cooperman H, Pisanty S, Shoshan S. Lack of influence of cyclosporin A on levels of gingival procollagen types I and III mRNAs in rats of different ages. *Arch Oral Biol* 1997;42(4):277-82.

Riccelli AE, Agarwal S, Piesco P, Hoffman RD, Suzuki JB. Role of cytokines in periodontal diseases. *J Calif Dent Assoc* 1995;23(8):48-51.

Rocha LA, Martins RC, Werneck CC, Feres-Filho EJ, Silva LC. Human gingival glycosaminoglycans in cyclosporin-induced overgrowth. *J Periodontal Res* 2000;35(3):158-64.

Romito GA, Pustiglioni FE, Saraiva L, Pustiglioni AN, Lotufo RF, Stolf NA. Relationship of subgingival and salivary microbiota to gingival overgrowth in heart transplant patients following cyclosporin A therapy. *J Periodontol* 2004;75(7):918-24.

Ross PJ, Nazif MM, Zullo T, Zitelli B, Guevara P. Effects of Cyclosporin A on gingival status following liver transplantation. *J Dent Child* 1989;56(1):56-9.

Rostock MH, Fry HR, Turner JE. Severe gingival overgrowth associated with cyclosporin therapy. *J Periodontol* 1986;57(5):294-9.

Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991;64(5):867-9.

Saito K, Mori S, Tanda N, Sakamoto S. Expression of p53 protein and Ki-67 antigen in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. *J Periodontol* 1999;70(6):581-6.

Saksela O, Rifkin DB. Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. *J Cell Biol* 1990;110(3):767-75.

Saraiva L. Avaliação da microbiota subgingival de pacientes transplantados renais antes e após terapia imunossupressora [Dissertação de Mestrado] São Paulo: Faculdade de Odontologia Universidade de São Paulo; 2000.

Schincaglia GP, Forniti F, Cavallini R, Piva R, Calura G, Del Senno L. Cyclosporin-A increases type I procollagen production and mRNA level in human gingival fibroblasts in vitro. *J Oral Pathol Med* 1992;21(4):181-5.

Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D, Green I. Interleukin 1 a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol* 1982;128(5):2177-82.

Schor SL, Ellis I, Irwin CR, Banyard J, Seneviratne K, Dolman C, et al. Subpopulations of fetal-like gingival fibroblasts: characterization and potential significance for wound healing and the progression of periodontal disease. *Oral Dis* 1996;2(2):155-66.

Schuller PD, Freedman HL, Lewis DW. Periodontal status of renal transplant patients receiving immunosuppressive therapy. *J Periodontol* 1973;44(3):167-70.

Sefton AM, Maskell JP, Beighton D, Whiley A, Shain H, Foyle D, et al. Azithromycin in the treatment of periodontal disease. Effect on microbial flora. *J Clin Periodontol* 1996;23(11):998-1003.

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

Seymour RA, Smith DG. The effect of a plaque control programme on the incidence and severity of cyclosporin-induced gingival changes. *J Clin Periodontol* 1991;18(2):107-10.

Seymour RA, Smith DG, Rogers SR. The comparative effect of azathioprine and cyclosporin on some gingival health parameters of renal transplant patients. *J Clin Periodontol* 1987;14(10):610-3.

Seymour RA, Smith DG, Turnbull DN. The effects of phenytoin and sodium valproate on the periodontal health of adult epileptic patients. *J Clin Periodontol* 1985;12(6):413-9.

Seymour RA, Thomason JM, Ellis JS. The pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1996;23(3 pt. 1):165-75.

Shimazu A, Bachchu MA, Morishita M, Noshiro M, Kato Y, Iwamoto Y. Expression of syndecan-2, -4, and fibroblast growth factor receptor type 1 in human

periodontal ligament fibroblasts and down-regulation of these membrane proteins during maturation in culture. *J Dent Res* 1999;78(12):1791-9.

Slavin J, Taylor J. Cyclosporin nifedipine and gingival hyperplasia. *Lancet* 1987;2(8561):739.

Sobhani S, Hassell T, Stone C. Patient age and susceptibility to cyclosporine gingival enlargement: In vitro study. [abstr IADR 1873]. *J Dent Res* 1986;68 Supl:416.

Somacarrera ML, Hernandez G, Acero J, Moskow BS. Factors related to the incidence and severity of cyclosporin-induced gingival overgrowth in transplant patients. A longitudinal study. *J Periodontol* 1994;65(7):671-5.

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

Spolidorio LC, Holzhausen M, Spolidorio DM, Nassar CA, Nassar PO, Muscara MN. Cyclosporin but not tacrolimus significantly increases salivary cytokine contents in rats. *J Periodontol* 2005;76(9):1520-5.

Stabellini G, Calastrini C, Mariani G, Gioia M, Caramelli E, Gagliano N, et al. Extracellular glycosaminoglycan changes in healthy and overgrown gingiva fibroblasts after cyclosporin A and cytokine treatments. *J Oral Pathol Med* 2004;33(6):346-53.

Stabellini G, Carinci F, Luigi Bedani P, Calastrini C, De Mattei M, Scapoli L, et al. Cyclosporin A and transforming growth factor beta modify the pattern of extracellular glycosaminoglycans without causing cytoskeletal changes in human gingival fibroblasts. *Transplantation* 2002;73(10):1676-9.

Suresh R, Puvanakrishnan R, Dhar SC. Alterations in human gingival glycosaminoglycan pattern in inflammation and in phenytoin induced overgrowth. *Mol Cell Biochem* 1992;115(2):149-54.

Suzawa H, Kikuchi S, Arai N, Koda A. The mechanism involved in the inhibitory action of tranilast on collagen biosynthesis of keloid fibroblasts. *Jpn J Pharmacol* 1992;60(2):91-6.

Syrjanen SM, Syrjanen KJ. Hyperplastic gingivitis in a child receiving sodium valproate treatment. *Proc Finn Dent Soc* 1979;75(5-6):95-98.

Takeuchi Y, Kodama Y, Matsumoto T. Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity. *J Biol Chem* 1994;269(51):32634-8.

Thomason JM, Sloan P, Seymour RA. Immunolocalization of collagenase (MMP-1) and stromelysin (MMP-3) in the gingival tissues of organ transplant patients medicated with cyclosporin. *J Clin Periodontol* 1998;25(7):554-60.

Thomason JM, Seymour RA, Ellis JS, Kelly PJ, Parry G, Dark J, et al. Iatrogenic gingival overgrowth in cardiac transplantation. *J Periodontol* 1995;66(8):742-6.

Tipton DA, Dabbous MK. Heterogeneity of gingival fibroblast response to cyclosporine. [abstr IADR 1457]. *J Dent Res* 1986;65 Supl:331.

Tipton DA, Pabst MJ, Dabbous MK. Interleukin-1 beta- and tumor necrosis factor-alpha-independent monocyte stimulation of fibroblast collagenase activity. *J Cell Biochem* 1990;44(4):253-64.

Tipton DA, Stricklin GP, Dabbous MK. Effect of cyclosporin on gingival fibroblast collagenolytic activity.[abstract IADR 1642] *J Dent Res* 1987;66:312.

Tipton DA, Stricklin GP, Dabbous MK. Fibroblast heterogeneity in collagenolytic response to cyclosporine. *J Cell Biochem* 1991;46(2):152-65.

Tollefsen T, Saltvedt E, Koppang HS. The effect of immunosuppressive agents on periodontal disease in man. *J Periodontal Res* 1978;13(3):240-50.

Tyldesley WR, Rotter E. Gingival hyperplasia induced by cyclosporin-A. *Br Dent J* 1984;157(9):305-9.

Van Bambeke F, Gerbaux C, Michot JM, D'yvoire MB, Montenez JP, Tulkens PM. Lysosomal alterations induced in cultured rat fibroblasts by long-term exposure to low concentrations of azithromycin. *J Antimicrob Chemother* 1998;42(6):761-7.

Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo R, Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin collagenase plasmin and heparanases. *J Biol Chem* 1996;271(17):10079-86.

Whitworth MK, Backen AC, Clamp AR, Wilson G, McVey R, Friedl A, et al. Regulation of fibroblast growth factor-2 activity by human ovarian cancer tumor endothelium. *Clin Cancer Res* 2005;11(12):4282-8.

Willershausen B, Lemen C, Schumacher U. Influence of cyclosporin-A on growth and extracellular matrix synthesis of human fibroblasts. *J Cell Physiol* 1992;152:397-402.

Williamson MS, Miller EK, Plemons J, Rees T, Iacopino AM. Cyclosporine A upregulates interleukin-6 gene expression in human gingiva: possible mechanism for gingival overgrowth. *J Periodontol* 1994;65(10):895-903.

Wirnsberger GH, Pfragner R, Mauric A, Zach R, Bogiatzis A, Holzer H. Effect of antibiotic treatment with azithromycin on cyclosporine A-induced gingival hyperplasia among renal transplant patients. *Transplant Proc* 1998;30(5):2117-9.

Wondimu B, Reinholt FP, Moder T. Stereologic study of cyclosporin A-induced gingival overgrowth in renal transplant patients. *Eur J Oral Sci* 1995;103(4):199-206.

Worapamorn W, Haase HR, Li H, Bartold PM. Growth factors and cytokines modulate gene expression of cell-surface proteoglycans in human periodontal ligament cells. *J Cell Physiol* 2001a;186(3):448-56.

Worapamorn W, Li H, Young WG, Bartold PM. Differential expression and distribution of syndecan-1 and -2 in the developing periodontium of the rat. *Connect Tissue Res* 2001b;42(1):39-48

Yamada H, Nishimura F, Naruishi K, Chou H, Takashiba S, Albright G, et al. Phenytoin and cyclosporin A suppress the expression of MMP-1 TIMP-1 and cathepsin L but not cathepsin B in cultured gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2000;71(6):955-60.

Yamaguchi M, Naruishi K, Yamada-Naruishi H, Omori K, Nishimura F, Takashiba S. Long-term cyclosporin A exposure suppresses cathepsin-B and -L activity in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 2004;39(5):320-6.

Yamasaki A, Rose GG, Pinero GJ, Mahan CJ. Ultrastructure of fibroblasts in cyclosporin A-induced gingival hyperplasia. *J Oral Pathol* 1987;16(3):129-34.

Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 1991;64(4):841-8.

Yoshida T, Nagata J, Yamane A. Growth factors and proliferation of cultured rat gingival cells in response to cyclosporin A. *J Periodontal Res* 2005;40(1):11-9.

Young RJ 3rd, Gilson RT, Yanase D, Elston DM. Cutaneous sarcoidosis. *Int J Dermatol* 2001;40(4):249-53.

Zebrowski E, Ramamurthy Singer DL, Brunka JR. Collagenase activity of cyclosporin nifedipine and phenytoin treated cells. [abstr IADR 1751]. *J Dent Res* 1988;67 Supl:331.

Zebrowski EJ, Pylypas SP, Odum O, Johnson RB. Comparative metabolism of 3H-glucosamine by fibroblast populations exposed to cyclosporine. *J Periodontol* 1994;65(6):565-7.

Zebrowski E, Singer DL, Brunka JR. Cyclosporin-A nifedipine and phenytoin: effects on gingival fibroblasts metabolism [abstr IADR 1456]. *J Dent Res* 1986;65 Supl:313.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética

PARECER nº 92/00

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa ***“Caracterização dos proteoglicanos de matriz extracelular no aumento gengival induzido pela Ciclosporina-A em humanos”***, de responsabilidade do pesquisador **Nelson Gnoatto**, sob orientação do Professor Doutor **Roberto Fraga Moreira Lotufo**.

São Paulo, 20 de setembro de 2000

Profa.Dra. **Célia Regina Martins Delgado Rodrigues**
Coordenadora do CEP-FOUSP