

CLÁUDIA MISUE KANNO

Efeitos da ciclosporina, fenitoína e nifedipina sobre a
síntese e degradação de colágeno da gengiva de
macacos-prego (*Cebus apella*)
Estudo histoquímico e através de RT-PCR

ARAÇATUBA
- 2006 -



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”



CAMPUS DE ARAÇATUBA – FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

ÁREA DE ESTOMATOLOGIA

CLÁUDIA MISUE KANNO

**Efeitos da ciclosporina, fenitoína e nifedipina sobre a
síntese e degradação de colágeno da gengiva de
macacos-prego (*Cebus apella*)
Estudo histoquímico e através de RT-PCR**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do
título de Doutor em Odontologia – Área de
Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Alvimar Lima de Castro

ARAÇATUBA
- 2006 -

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

K16e	Kanno, Cláudia Misue Efeitos da ciclosporina, fenitoína e nifedipina sobre a síntese e degradação de colágeno da gengiva de macacos-prego (<i>Cebus apella</i>): estudo histoquímico e através de RT-PCR / Cláudia Misue Kanno. - Araçatuba : [s.n.], 2006 75 f. : il. ; tab. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2006 Orientador: Prof. Dr. Alvimar Lima de Castro 1. Crescimento excessivo da gengiva – Induzido quimicamente Ciclosporina 3. Fenitoína. 4. Colágeno tipo I. 5. MMP-1. 6. MMP-2 não hidrossolúveis Black D6 CDD 617.63
------	---



Apreendi com meus pais que a vida é algo muito especial: não deve ser vivida de outra forma que não seja intensa, mesmo que isso, às vezes, signifique errar. Nunca me aconselharam a ser perfeita, a ser a melhor, apenas a ser feliz, mas que a felicidade só é plena quando calcada em valores éticos. Não só me amaram; me aceitaram apesar de todas as minhas imperfeições e erros.

Apreendi com o Professor Alvimar que o Tempo que gastamos fazendo o que gostamos nunca é “tempo perdido”. O Tempo é um aliado valioso no nosso processo de crescimento, pois é ele que traz novas experiências, amadurece idéias, permite que pessoas com novos pensamentos entrem em nosso caminho.

Apreendi com o Professor Américo que, se queremos colher bons frutos, devemos plantar boas sementes. Crescer é uma arte, devemos exercê-la com esmero, superando dificuldades que nunca devem ser motivo de desencanto, e sim, um estímulo para um salto a um patamar mais alto.

Apreendi com os Professores Fernando, Caris, Sílvia, Renato, e Marcelo que crescer sozinho é muito chato. Crescemos muito mais rápido quando estamos organizados como um grupo em que a palavra “juntos” é a mola mestre.

Apreendi com os Professores Cláudio, Ana Maria, Edilson e Buratini que conhecimento é algo que deve ser partilhado. Um cérebro cheio de conhecimentos não tem valor se não houver um coração cheio de generosidade.

Apreendi com o Junqueira e o Arnaldo que ética em experimentação também se exerce quando damos carinho ao animal.

Apreendi com a To, o Sérgio, o Gustavo, a Luciana, o Juliano, a Val e a Érica que crescimento, muitas vezes, é sinônimo de sonho, algo valioso pelo qual devemos lutar com toda nossa garra.

Apreendi que, para crescermos, precisamos não só de apoio como o que recebi do Professor Poi e do Zanon, mas também da experiência e ajuda de pessoas como a Elaine, o Marcelinho, o Pedro, a Da. Luzia e a Ana.





Aos meus Pais, Akio e Fujiko,
meus grandes Mestres,
e à minha irmã, Lúcia,
dedico com carinho este trabalho





Professor Doutor Alvimar Lima de Castro;
Professor Doutor José Américo de Oliveira;
Professor Doutor José Fernando Garcia;
Professora Doutora Caris Maroni Nunes ;
Professora Doutora Silvia Helena Venturoli Perri
Professor Doutor Renato Sundfeld;
Professor Doutor Marcelo Macedo Crivelini;
Professor Doutor Cláudio Aparecido Casatti;
Professor Doutor Edílson Ervolino;
Professor Doutor José Buratini Junior;
Professora Dorutora Ana Maria Pires Soubhia
Professor Doutor Wilson Roberto Poi;
Sr. José Ari Gualberto Junqueira;
Sr. Arnaldo César dos Santos;
Doutora Célia Tomiko Matida Hamata Saito;
Doutor Sérgio Moraes Aoki;
Doutor Gustavo Avelar Arbex;
Doutora Luciana Simonato
Srta. Valquíria Rissato Gazoli;
Dra. Érica de Souza Ribeiro;
Sr. Juliano Rodrigues Sangalli;
Sr. José Fernando Zanon;
Sra. Elaine Cristina Francischini Ferreira
Sr. José Marcelo Tramarin
Sr. Pedro Luís Florindo;
Sra. Luzia Maria de Oliveira Francischini
Sra. Ana Cláudia M. Grieger Manzatti

Meus eternos agradecimentos por me ensinarem, de forma tão generosa, que crescer é algo
que nunca conseguimos fazer sozinhos.

KANNO, C. M. **Efeitos da ciclosporina, fenitoína e nifedipina sobre a síntese e degradação de colágeno da gengiva de macacos-prego (*Cebus apella*). Estudo histoquímico e através de RT-PCR.** 2006. 75f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.

RESUMO

INTRODUÇÃO: As alterações em gengiva induzidas por medicamentos têm sido pouco estudadas quanto à expressão *in vivo* dos genes das metaloproteinases (MMPs). O objetivo do presente trabalho foi avaliar o padrão histológico de distribuição de fibras colágenas após a administração de ciclosporina, nifedipina ou fenitoína e correlacionar com a expressão dos genes do colágeno do tipo I, MMP-1 e MMP-2.

MATERIAL E MÉTODO: Amostras da gengiva da área de canino superior direito foram obtidas de doze macacos prego (*Cebus apella*) machos. A extremidade mesial de cada amostra foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido enquanto que a distal foi processada para inclusão em parafina. Após uma semana, os animais foram divididos em três grupos que receberam doses diárias de ciclosporina, fenitoína ou nifedipina, durante 120 dias. Procedeu-se à remoção de amostras da gengiva da área do canino superior esquerdo de dois animais de cada grupo aos 52 e 120 dias. Os cortes histológicos foram corados pelas técnicas da hematoxilina e eosina, vermelho picrossirius, além da marcação imunoistoquímica para colágeno do tipo IV. O RT-PCR semiquantitativo foi realizado para se determinar os níveis de mRNA.

RESULTADOS: No grupo controle, houve o predomínio de fibras colágenas maduras, evidenciadas com a cor vermelha em cortes corados pela técnica do vermelho picrossirius analisados com microscópio de luz polarizada. Observou-se nos grupos tratados aos 52 e 120 dias um aumento da porcentagem de áreas ocupadas por fibras imaturas, em todos os grupos, independentemente da idade do animal. No entanto, não foram observadas diferenças morfológicas entre os grupos controle e tratado nos cortes corados pela hematoxilina e eosina. Houve uma tendência a valores médios mais baixos de expressão da MMP-1 em todos os grupos, aos 52 dias. Contudo, as expressões da MMP-2 e colágeno do tipo I parecem estar sujeitas a mudanças físicas e dependentes do medicamento.

CONCLUSÃO: Os resultados permitiram concluir que a ciclosporina, fenitoína e nifedipina ocasionam padrões diferentes de expressão genética, resultando em metabolismo de colágeno alterado, independentemente da idade do animal e ausência de sinais clínicos evidentes de crescimento gengival. As alterações não ocorrem de forma uniforme ao longo do corte histológico.

Palavras-chave: Crescimento excessivo da gengiva - induzido quimicamente. Ciclosporina. Fenitoína. Nifedipina. Colágeno tipo I. MMP-1. MMP-2.

KANNO, C. M. **Effects of cyclosporin, phenytoin and nifedipine on synthesis and degradation of gingival collagen in tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*). Histochemical and MMP-1, MMP-2 and collagen type I gene expression analysis.** 2006. 75f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.

ABSTRACT

Background: Few studies have focused on the *in vivo* expression of matrix metalloproteinase (MMP) genes in gingival changes induced by drugs. The aim of the present study was to evaluate the histological pattern of collagen fiber distribution after phenytoin, cyclosporine or nifedipine medication and correlate with collagen type 1, MMP-1 and MMP-2 gene expression levels. **Methods:** Gingival samples were obtained from superior right canine area of twelve male capuchin monkeys (*Cebus apella*). The mesial part of the biopsy specimens was immediately frozen in liquid nitrogen, while the distal one was processed for paraffin inclusion. One week after the control biopsy, the animals were divided in three groups that received daily doses of cyclosporine, phenytoin or nifedipine during 120 days. Gingival samples were obtained from left superior canine area on 52nd and 120th day of treatment (two animal of each experimental group). Histologic sections were subjected to hematoxylin and eosin, picrosirius red stainings, and to immunohistochemical reaction for collagen type IV. MMP-1, MMP-2 and collagen type I mRNA levels were determined by RT-PCR.

Results: Predominance of mature collagen fibers was observed in the control group after picrosirius red staining, visualized as red fibers under polarized microscope. Increased percentage of areas occupied by immature collagen fibers was observed on 52 and 120 experimental periods, in all groups, despite the animal age. However, no morphological differences between treated and control groups were observed on hematoxylin and eosin stained sections. There was a trend to lower levels of MMP-1 expression on 52-day samples. However, MMP-2 and collagen type I gene expressions seemed to be phased and drug-related.

Conclusions: The results allowed the conclusion that cyclosporine, phenytoin and nifedipine lead to different gene expression patterns, resulting in impaired collagen metabolism, despite animal age and lack of overt clinical signs. Histologic changes were not uniform all over each section.

Keywords: Gingival overgrowth – chemically induced. Cyclosporine. Phenytoin. Nifedipine. Collagen type I. MMP-1. MMP-2

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Aspectos clínicos e respectivas fotomicrografias de gengiva de macacos. Cortes transversais corados com vermelho picrosírius. (A) Animal 3, adulto jovem, antes do tratamento com ciclosporina. (B) Fotomicrografia de biópsia gengival no animal da figura A - predomínio de fibras vermelhas e alaranjadas. Aumento original de 200x. (C) Crescimento gengival observado no animal 3, após 120 dias de tratamento com ciclosporina. (D) Fotomicrografia de biópsia gengival no animal da figura C - predomínio de fibras verdes e amarelas. Aumento original de 200x. (E) Animal 10, adulto, antes do tratamento com fenitoína. (F) Fotomicrografia de biópsia gengival no animal da figura E - predomínio de fibras vermelhas e alaranjadas. Indicação das camadas TCO, TCI e TCS. Aumento original de 100x. 34
- FIGURA 2** Aspectos clínicos e respectivas fotomicrografias de gengiva de macacos. Cortes transversais corados com vermelho picrosírius. (A) Animal 10, após 52 dias de tratamento com fenitoína. Ausência de sinais clínicos de crescimento gengival. (B) Fotomicrografia de biópsia gengival no animal da figura A - predomínio de fibras verdes e amarelas. Aumento original de 100x. (C) Animal 12, adulto jovem, antes do tratamento com nifedipina. (D) Fotomicrografia de biópsia gengival no animal da figura C - predomínio de fibras vermelhas e alaranjadas. Aumento original de 100x. (E) Crescimento gengival observado no animal 12, após 52 dias de tratamento com nifedipina. (F) Fotomicrografia de biópsia gengival no animal da figura E - predomínio de fibras amarelas e verdes. Aumento original de 100x. 35
- FIGURA 3** Fotomicrografias de cortes transversais de gengiva de macacos. (A) Fotomicrografia de biópsia gengival no animal 12, antes do tratamento com nifedipina. Marcação imunoistoquímica para colágeno IV. Aumento original de 100x. (B) Fotomicrografia de biópsia gengival no animal 12, após 52 dias de tratamento com nifedipina. Marcação imunoistoquímica para colágeno IV. Aumento original de 100x. (C) Animal 8, antes do tratamento com fenitoína. HE. Aumento original de 100x. (D) Fotomicrografia da mesma amostra da figura C, corada pela técnica do vermelho picrosírius. Predomínio de fibras vermelhas e alaranjadas. Aumento original de 100x. (E) Animal 8, após 52 dias de tratamento com fenitoína. HE. Aumento original de 100x. (F) Fotomicrografia da mesma amostra da figura E corada pela técnica do vermelho picrosírius. Predomínio de fibras amarelas e verdes. Aumento original de 100x. 36
- FIGURA 4** Distribuição das porcentagens das áreas ocupadas pelas diferentes cores após a coloração pelo vermelho picrosírius. Grupo tratado com Ciclosporina (A), Fenitoína (B) e Nifedipina (C). TCO= Tecido conjuntivo associado ao epitélio oral; TCI= Tecido conjuntivo localizado na camada profunda da lâmina própria; TCS= Tecido conjuntivo associado ao epitélio sulcular 37

FIGURA 5	Efeito da Ciclosporina (A), Fenitoína (B) e Nifedipina (C) sobre a expressão dos genes do colágeno do tipo 1, MMP-1 e MMP-2. Valores relativos médios de mRNA (Média+ Desvio Padrão).	38
FIGURA 6	Validação do número de ciclos. Colágeno – 29 (A), MMP-2 – 27 (B), MMP-1 – 32 (C), e Beta-globina – 29 (D).	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Características dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes da MMP-1, MMP-2, Col1 α 1 e betaglobina.	27
Tabela 2	Características dos animais e doses individuais dos medicamentos, a partir do oitavo dia de tratamento.	75

LISTA DE ABREVIATURAS

MMP= do inglês Matrix Metaloproteinase

RT-PCR= do inglês Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction

DNA= do inglês Deoxyribonucleic Acid

mRNA= do inglês messenger Ribonucleic Acid

cDNA= do inglês complementary DNA

TCO= Tecido conjuntivo associado ao epitélio oral

TCI= Tecido conjuntivo localizado na camada profunda da lâmina própria

TCS= Tecido conjuntivo associado ao epitélio sulcular

dNTP= do inglês Deoxyribonucleotide triphosphate

DEPC= Dietilpirocarbonato

TBE= Tris, ácido bórico e EDTA

Col1 α 1= Colágeno do tipo I, cadeia α

TGF- β = do inglês Transforming Growth Factor – beta

DAB= Diaminobenzidina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	MATRIZ EXTRACELULAR	11
1.2	CRESCIMENTO EXCESSIVO DA GENGIVA INDUZIDO POR MEDICAMENTOS	15
1.3	ALTERAÇÕES DA MATRIZ EXTRACELULAR	18
1.4	ALTERAÇÕES CELULARES	21
2	MATERIAL E MÉTODO	23
2.1	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	24
2.2	RT-PCR	25
3	RESULTADOS	29
3.1	OBSERVAÇÕES CLÍNICAS	29
3.2	GRUPO CONTROLE	29
3.3	52 DIAS	30
3.4	120 DIAS	31
3.5	SEQÜENCIAMENTO DOS PRODUTOS DO RT-PCR	33
4	DISCUSSÃO	39
5	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48
	ANEXOS	63

1 INTRODUÇÃO

O crescimento excessivo da gengiva induzido por medicamentos foi inicialmente descrito em pacientes sob tratamento anticonvulsivo com a fenitoína. Posteriormente, outras drogas também foram identificadas como causadoras de crescimentos gengivais, como o imunossupressor ciclosporina e bloqueadores de canais de cálcio. Dentre as últimas drogas, pode-se citar o diltiazem, felodipina, nitrendipina, verapamil, amilopiridina, bepridil, bleomicina, isradipina, nicardipina, nimodipina, nisoldipina, oxidipina. Entretanto, a nifedipina é a que induz crescimentos gengivais com maior frequência (MARSHALL; BARTOLD, 1999; NEVILLE et al., 2004).

As características clínicas e histológicas dos crescimentos excessivos da gengiva são semelhantes, independentemente do medicamento usado. As lesões são caracterizadas por aumentos das papilas gengivais e gengiva inserida, que podem se desenvolver a ponto de recobrir as coroas dentárias e/ou interferir na oclusão dental (NEVILLE et al., 2004). A higienização adequada pode se tornar difícil, ocasionando o acúmulo de irritantes que, por sua vez, agravam o quadro clínico.

Histologicamente, observam-se alongamentos epiteliais em direção ao tecido conjuntivo. A matriz extracelular apresenta feixes espessos de fibras colágenas dispostos irregularmente (ROMANOS et al., 1993b).

O colágeno é a principal proteína fibrosa insolúvel presente na matriz extracelular e nos tecidos conjuntivos (LODISH et al., 2000) e por isso, tem sido o foco de vários estudos sobre crescimento gengival. Apesar do aumento evidente da matriz extracelular, foi constatado que há uma diminuição na síntese de colágeno induzida pela nifedipina (KATAOKA et al., 2001; McKEVITT; IRWIN, 1995,

NISHIKAWA et al., 1991), ciclosporina (MARIOTTI et al., 1998) e fenitoína (KATO et al., 2005; SALO et al., 1990). Esses dados levaram os autores a concluir que o acúmulo de fibras colágenas é causado por uma diminuição de sua degradação ao invés de um aumento de sua síntese.

A degradação do colágeno pode ocorrer através de fagocitose (KATAOKA et al., 2001) ou pela ação de enzimas extracelulares (BIRKEDAL-HANSEN, 1993). A degradação intracelular de fibras colágenas representa um mecanismo de controle na manutenção do tecido conjuntivo altamente seletivo e preciso, embora seus fatores indutores não sejam ainda bem definidos. A degradação extracelular é menos precisa e é realizada através de um grupo de enzimas denominadas metaloproteinases de matriz (MMP). Essas enzimas são altamente específicas e essenciais para o início da degradação do colágeno (MONTES; JUNQUEIRA, 1991).

Zebrowski et al. (1988) compararam a produção de collagenase por fibroblastos de gengiva humana mantidos em cultura com a adição de ciclosporina, nifedipina e fenitoína. Os autores observaram um aumento na atividade enzimática induzida pela nifedipina e diminuição no grupo da fenitoína. O grupo da ciclosporina não apresentou alterações. Dentro das condições do estudo, os autores concluíram que a collagenase não exerce um papel significativo no desenvolvimento do crescimento gengival. No entanto, uma diminuição *in vitro* da expressão de genes responsáveis pela transcrição de MMPs foi descrita com a ciclosporina (BOLZANI et al., 2000; COTRIN et al., 2002, HYLAND et al., 2003) e fenitoína (KATO et al., 2005).

Os mecanismos biológicos envolvidos na patogênese do crescimento excessivo da gengiva ainda não são conhecidos e geram controvérsias entre diversos

autores. Algumas dificuldades devem ser consideradas, como a possibilidade de condições diferentes de cultura e de linhagens celulares gerarem resultados contraditórios (JAMES et al., 1998). Além do mais, o desenvolvimento da lesão parece ocorrer em fases (HASSEL et al., 1982; SPOLIDORIO et al., 2004), nas quais há a participação de fatores indutores em uma cascata de eventos cronologicamente específica para cada tipo de medicamento (UZEL et al., 2001).

Acredita-se, por outro lado, que estudos *in vivo*, com análises em tempos padronizados após o início da terapêutica com drogas que interfiram no metabolismo gengival, poderão trazer novos conhecimentos.

Desta forma, o propósito do presente trabalho é analisar histologicamente a quantidade de colágeno em crescimentos gengivais induzidos em macacos pela ciclosporina, nifedipina ou fenitoína e correlacioná-los com a expressão dos genes responsáveis pela transcrição da MMP-1, MMP-2 e colágeno do tipo I.

1.1 MATRIZ EXTRACELULAR

As células são circundadas por uma rede intrincada de proteínas e polissacarídeos denominada matriz extracelular. A quantidade relativa de seus componentes e a forma como se organizam determinam as propriedades físicas do tecido conjuntivo, além de ter um papel importante na diferenciação e migração seletiva de células, disponibilização de enzimas e de fatores de crescimento, através do confinamento de moléculas secretadas pelas células (ALBERTS et al., 2002).

Os componentes da matriz extracelular podem ser divididos em três classes: proteínas fibrilares (colágeno, elastina), glicosaminoglicanas e proteínas multiadesivas da matriz (LODISH et al., 2000).

Há pelo menos dezesseis tipos de colágeno descritos, cada um expresso por um gene diferente, embora cerca de 80 a 90% do colágeno encontrado no organismo humano sejam classificados em tipos I, II e III (LODISH et al., 2000). As diferentes distribuições, organizações espaciais e combinações dos tipos de colágeno possibilitam uma variedade de graus de resistência à força tensiva, de acordo com a demanda funcional de cada tecido. Os colágenos dos tipos I, II, III, V e XV têm um arranjo em fibras, enquanto que os do tipo IV e VII têm uma disposição semelhante à do feltro. Os colágenos dos tipos IX e XII ocorrem associados aos tipos fibrilares e participam da organização do arranjo espacial das fibras na matriz extracelular (ALBERTS et al., 2002).

O colágeno do tipo I é considerado a proteína mais abundante dos tecidos conjuntivos. Suas fibrilas se arranjam em feixes paralelos com bandas que se repetem a cada 67 nm, o que gera birrefringência e estriação quando analisadas em microscópios ópticos e eletrônicos (LODISH et al., 2000).

Na gengiva, há uma predominância evidente de fibras colágenas na matriz extracelular. Dentre estas, acredita-se que as constituídas pelo tipo I sejam as mais abundantes. Essas fibras estão dispostas em feixes que apresentam uma distribuição uniforme, ordenada e orientada de forma a permitir uma inserção firme da gengiva ao cimento, periósteo e outras áreas gengivais, o que confere uma forte resistência ao tracionamento (NARAYANAN et al., 1985).

O colágeno do tipo III se apresenta como uma rede delicada de fibrilas e tem sido correlacionado com as fases iniciais do processo de regeneração tecidual (CHAVRIER et al., 1984; MILLER et al., 2002; SCULEAN et al., 2002; WERFULLY et al., 2002). Em tecido gengival, o colágeno do tipo III pode ser observado principalmente próximo ao epitélio (NARAYANAN et al., 1985) na forma de fibras delgadas (CHO et al., 1984).

Diversas técnicas de imunoistoquímica e histoquímica têm possibilitado o estudo da distribuição e organização dos vários tipos de colágeno nos diversos tecidos. Dentre as técnicas histoquímicas, podem ser destacadas as do tricrômico de Masson, van Gienson, Mallory e vermelho picrosirius. A técnica de coloração pelo vermelho picrosirius tem se apresentado como a mais adequada e específica para o estudo de fibras colágenas, por ser simples, confiável, sensível e barata. Através dessa técnica, grupos sulfônicos ácidos do vermelho sirius interagem fortemente com moléculas de colágeno, que são ricas em aminoácidos básicos. Esta reação ocasiona o aumento da birrefringência das fibras colágenas (MONTES; JUNQUEIRA, 1991).

As fibras colágenas coradas com a técnica do vermelho picrosirius e analisadas com o uso de microscópio de luz polarizada adquirem cores que variam do verde, amarelo, laranja e vermelho. Há um consenso entre os autores de que as cores

amarela, laranja e vermelha representam o aumento gradativo da espessura das fibras colágenas (DAYAN et al., 1989). Montes e Junqueira (1991) afirmam que a cor verde evidencia as fibras colágenas do tipo III, as quais são mais delgadas e fracamente birrefringentes. Já Rich e Whittaker (2005) acreditam que todas as variações de cor são decorrentes da maturação e espessamento progressivos das fibras colágenas do tipo I.

Sabe-se que as proteínas fibrilares ficam imersas em um gel composto por glicosaminoglicanas. Por serem altamente hidratadas, essas macromoléculas são as principais responsáveis pelo volume da matriz extracelular e pela resistência às forças de compressão do tecido. As glicosaminoglicanas formam um gel poroso que permite a difusão rápida de nutrientes, metabólitos e hormônios entre a circulação sangüínea e as células (ALBERTS et al., 2002).

As proteínas multiadesivas da matriz têm a função principal de mediar a adesão das células à matriz extracelular, o que regula a migração e a morfologia celular (LODISH et al., 2000). Dentre as proteínas multiadesivas da matriz, pode-se citar a fibronectina, uma glicoproteína que possibilita a adesão de células aos tipos fibrilares de colágeno, o que a torna essencial para a migração e diferenciação de muitos tipos celulares durante a embriogênese. A fibronectina também facilita a migração de macrófagos e de outras células do sistema imunológico durante o processo de reparo de feridas (LODISH et al., 2000). Em gengiva, forma uma rede fibrilar espessa e amplamente distribuída (NARAYANAN et al., 1985), com uma alta concentração na região mais coronária de papilas gengivais (CHO et al., 1984; 1985; ROMANOS et al., 1993b). Seus feixes formam uma conexão entre fibras colágenas e uma variedade de células, tais como fibroblastos, linfócitos, células endoteliais e neutrófilos (CHO et al., 1984; 1986).

A exposição de sítios promigratórios dos diversos componentes da matriz extracelular é uma etapa que precede a sua interação com a célula. Para que esse fenômeno ocorra, é necessária a participação de enzimas que promovem a proteólise específica de macromoléculas da matriz extracelular (NAGASE; WOESSNER JUNIOR, 1999). Desta forma, as MMPs modulam a interação entre a célula e a matriz extracelular. No entanto, a principal função dessas endopeptidases é a degradação do tecido durante processos fisiológicos de remodelação ou mesmo patológicos, como a invasão tecidual por células malignas.

Até a presente data, foram descritas 21 MMPs em humanos, divididas em subgrupos de acordo com sua estrutura e especificidade de substrato (REUNANEN; KÄHÄRI, 2003). Em conjunto, podem degradar todos os componentes da matriz extracelular (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; LODISH et al., 2000). A regulação da atividade das MMPs pode ocorrer em quatro níveis: controle da transcrição de seus genes através de fatores de crescimento e citocinas; ativação dos seus precursores; especificidade do substrato; e por fim, sua inibição através de α -macroglobulinas e inibidores teciduais (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

A MMP-1 pode ser encontrada em áreas em desenvolvimento, de reparo tecidual ou de infiltração de células malignas. Em gengiva, pode ser observada em áreas em fase de remodelação ou associadas à infiltração de células inflamatórias (MEIKLE et al., 1994; WOOLLEY; DAVIES, 1981). A MMP-1 degrada os colágenos dos tipos II, III, VII, VIII, X (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; 1995; REUNANEN; KÄHÄRI, 2003), mas principalmente o do tipo I (MILLER et al., 2002). A MMP-2 tem com substratos a fibronectina, elastina, colágeno dos tipos I, IV, V, VII, X, gelatina, fibrilina, tenascina, osteonectina e decorina (REUNANEN; KÄHÄRI, 2003).

A degradação do colágeno também pode ocorrer através de fagocitose (KATAOKA et al., 2001), que é mais precisa que a proporcionada pelas MMPs. A fagocitose representa um mecanismo altamente seletivo e preciso de controle de manutenção do tecido conjuntivo, embora seus fatores indutores não sejam ainda bem definidos. Em condições normais há um equilíbrio entre a síntese e a degradação de matriz extracelular, o que mantém o volume e a integridade do tecido conjuntivo.

1.2 CRESCIMENTO EXCESSIVO DA GENGIVA INDUZIDO POR MEDICAMENTOS

O aumento do tecido gengival pode ser idiopático, hereditário ou induzido por medicamentos. Dentre os medicamentos que induzem ao crescimento gengival, destacam-se a fenitoína, a nifedipina e a ciclosporina.

A fenitoína tem sido usada há mais de seis décadas para o controle de crises convulsivas, neuralgias e arritmias ventriculares. A dose terapêutica diária varia de 300 a 600 mg, de acordo com as características individuais do caso. A fenitoína é absorvida de forma lenta e variável no intestino e cerca de 90% se liga às proteínas plasmáticas (MARSHALL; BARTOLD, 1999). Há indícios de que um nível plasmático mínimo de fenitoína seja necessário para dar início aos processos biológicos que promovem o crescimento gengival (STAPLE et al., 1977). Acima deste nível foi descrita uma correlação positiva de dose-dependência e severidade da lesão (ADDY et al., 1983; STAPLE et al., 1977). No entanto, esta correlação não foi observada por Brunet et al. (2001). A concentração da fenitoína na saliva é proporcional à dos níveis plasmáticos (MORISAKI et al., 1990; STAPLE et al., 1977). Pacientes mais jovens parecem ser mais suscetíveis ao crescimento gengival induzido pela fenitoína (ADDY et al., 1983).

O crescimento gengival induzido pela ciclosporina foi inicialmente descrito por Calne et al. em 1981, e tem efeito mais severo que o induzido pela fenitoína (SPOLIDORIO et al., 2002) e nifedipina (NISHIKAWA et al., 1996). A ciclosporina tem sido usada como imunossupressor, em doses terapêuticas diárias que variam de 300 a 920 mg, em pacientes portadores de órgão transplantado ou de doenças auto-imunes. Acredita-se que esse medicamento tenha uma melhor absorção na forma de microemulsão (Neoral), o que tornaria sua biodisponibilidade e pico de concentração plasmática mais constantes (MARSHALL; BARTOLD, 1999).

Há evidências de que seja necessária uma concentração plasmática mínima de ciclosporina e/ou de seus metabólitos para induzir algum crescimento gengival. Entretanto, ainda não está bem estabelecida uma correlação entre dosagem e severidade da lesão em concentrações maiores, já que outras variáveis relacionadas aos pacientes e às condições locais parecem concorrer para o seu desenvolvimento. Não há diferenças nos níveis plasmáticos de ciclosporina entre pacientes portadores ou não de lesão gengival (MCGAW et al., 1987). No entanto, em um estudo realizado por Daley et al. (1986), todos os pacientes que receberam doses acima de 700 mg por dia apresentaram algum grau de crescimento gengival. Esse dado é condizente com estudos nos quais foi observada a indução à lesão ou de seus mecanismos, diretamente proporcionais à dose utilizada (COTRIM et al., 2002; FU et al., 1995; MELLER et al., 2002). Por outro lado, podem ser encontrados outros trabalhos cujos resultados não confirmam os dos autores acima (DALEY et al., 1986; WYSOCKI et al., 1983).

Um dos metabólitos da ciclosporina, a hidroxíciclosporina, também induz a respostas biológicas condizentes com crescimento gengival (MARIOTTI et al., 1998). A ciclosporina é secretada também na saliva e no fluido sulcular gengival,

podendo ser adsorvida na placa bacteriana, que pode assim atuar como um reservatório (McGAW et al., 1987). Daley et al. (1986) e Nishikawa et al. (1996) relataram que indivíduos jovens e do sexo masculino têm uma maior suscetibilidade ao crescimento gengival induzido pela ciclosporina, dados estes que não foram confirmados por McGaw et al. (1987) e por Redlich et al. (1997).

A nifedipina atua como bloqueadora de canais de cálcio e tem sido prescrita para o controle de doenças cardiovasculares, principalmente a hipertensão. Estudos experimentais demonstraram que ela induz ao crescimento gengival desde que uma concentração plasmática mínima seja atingida (ISHIDA et al., 1995). Porém não foi observada uma correlação de dose-dependência em relação à severidade do crescimento gengival (MIRANDA et al., 2001; MORISAKI et al., 1993). A dose necessária para a indução ao crescimento gengival em ratos é proporcionalmente alta quando comparada à usada em humanos, mas próxima àquela que lhes proporciona um efeito anti-hipertensivo (NISHIKAWA et al., 1996). O sexo masculino parece ser mais propenso ao crescimento gengival induzido pela nifedipina (ELLIS et al., 1999; ISHIDA et al., 1995, NISHIKAWA et al., 1996), assim como os jovens (DALEY et al., 1986, ISHIDA et al., 1995). A presença de placa bacteriana, embora não seja imprescindível ao crescimento gengival, aumenta sua severidade (MORISAKI et al., 1993; THOMASON et al., 1993,).

A semelhança de características histológicas entre os crescimentos gengivais induzidos por diversas drogas levou à pesquisa de uma base comum dos efeitos farmacológicos da nifedipina, fenitoína e ciclosporina. Acredita-se que a alteração no metabolismo do cálcio, comum entre os três medicamentos citados, seja o fator desencadeante do crescimento gengival (HALLMON; ROSSMANN, 1999; NISHIKAWA et al., 1996; SEYMOUR et al., 1996; THOMASON et al., 1993). McGaw

e Porter (1988) acreditam que o cálcio seja particularmente importante na promoção da fagocitose. Por outro lado, Marshall e Bartold (1999) acreditam que eventos moleculares diferentes podem resultar em modificações teciduais e celulares semelhantes.

1.3 ALTERAÇÕES DA MATRIZ EXTRACELULAR

As alterações da matriz extracelular induzidas por medicamentos têm sido estudadas extensamente. No entanto, tais pesquisas têm gerado resultados conflitantes, de forma que os mecanismos envolvidos ainda não são claramente compreendidos.

A manutenção da matriz extracelular depende de um balanço entre a síntese e a degradação de seus diversos componentes. Não há um consenso se o crescimento gengival induzido por medicamentos é causado por um aumento na síntese de colágeno ou de glicosaminoglicanas, ou se há uma diminuição na degradação desses componentes.

Os eventos moleculares que levam ao crescimento gengival podem ocorrer em diversos níveis: expressão dos genes relacionados à síntese de proteínas da matriz extracelular ou das enzimas que as degradam; tempo de atividade dos mRNAs que traduzem as proteínas da matriz; ou mesmo através de mecanismos extracelulares de controle de ativação e inibição de enzimas.

Estudos *in vivo* mostraram uma menor quantidade de colágeno e um aumento de proteoglicanas e glicosaminoglicanas em crescimentos gengivais induzidos pela fenitoína (DAHLLÖF et al., 1986; HALL; SQUIER, 1982). *In vitro*, a fenitoína ocasiona uma diminuição da atividade colagenolítica (HASSEL, 1982;

KATO et al., 2005; YAMADA et al., 2000;), induz à diminuição na síntese de colágeno do tipo I (SALO et al., 1990) e III (KATO et al., 2005), além de inibir a endocitose de colágeno por fibroblastos de gengiva (KATO et al., 2005).

Fujii et al. (1994) observaram, *in vitro*, um aumento da síntese de colágeno induzido pela nifedipina, o qual era mais evidente nas culturas de fibroblastos provenientes de pacientes portadores de crescimento gengival. Entretanto, esses dados não foram confirmados por McKevitt e Irwin (1995). *In vivo*, a nifedipina induziu à diminuição da expressão do gene do colágeno do tipo I, ao mesmo tempo em que, *in vitro*, ocasionou uma redução da capacidade de fagocitose dos fibroblastos (KATAOKA et al., 2001). Romanos et al (1993b) observaram um aumento de fibras colágenas dos tipos I e III em crescimentos gengivais causados pela nifedipina. O aumento de glicosaminoglicanas sulfatadas e de ácido hialurônico não parece fazer parte das alterações induzidas pela nifedipina (MARTINS et al., 2003).

O crescimento gengival induzido pela ciclosporina tem sido atribuído ao acúmulo de fibras colágenas, mas há pesquisas que mostram ocorrer às custas de uma maior quantidade de substância fundamental amorfa (MARIANI et al., 1993; 1996; PISANTY et al., 1988; ZEBROWSKI et al., 1994). Não há realmente um consenso entre os pesquisadores, pois há relatos de aumento da síntese de colágeno (SCHINCAGLIA et al., 1992), de diminuição (MARIOTTI et al., 1998) e mesmo, de nenhuma alteração (REDLICH et al., 1997, GAGLIANO et al., 2004). Por outro lado, James et al. (1998) observaram que pode ocorrer aumento ou diminuição na síntese de colágeno dos tipos I e III, de acordo com as condições de cultura e de linhagens celulares.

Estudos mostraram que o mecanismo de ação principal da ciclosporina no processo de acúmulo de componentes da matriz extracelular está associado à diminuição na síntese de metaloproteinases (HYLAND et al., 2003; THOMASON et al., 1998), juntamente com uma diminuição na atividade fagocitária de fibroblastos (McGAW; PORTER, 1988). Já foram descritas diminuições na síntese ou na expressão do gene da MMP-1 (BOLZANI et al., 2000; HYLAND et al., 2003; THOMASON et al., 1998), MMP-2 (BOLZANI et al., 2000; COTRIM et al., 2002) e MMP-3 (BOLZANI et al., 2000).

Apesar da semelhança morfológica dos crescimentos gengivais induzidos pelos diferentes medicamentos, há padrões característicos de distribuição e composição da matriz extracelular, o que se comprovou através de técnicas imunoistoquímicas (BONNAURE-MALLET et al., 1995; ROMANOS et al., 1992; UZEL et al., 2001).

Romanos et al. (1992) observaram que a nifedipina, a ciclosporina e a difenilhidantoína ocasionam distribuições características de fibronectina, o que poderia diferenciar as lesões induzidas por cada medicamento. O padrão de distribuição de colágenos dos tipos IV, V e VI também foi peculiar a cada tipo de droga indutora (ROMANOS et al., 1993a). Bonnaure-Mallet et al. (1995) descreveram quantidades diferentes de vários tipos de colágeno, além de diferenças na distribuição de fibronectina, fibras elásticas, vasos sangüíneos e fibroblastos, em crescimentos gengivais induzidos pela ciclosporina, nifedipina e hidantoína. Os autores aventaram a hipótese de que cada medicamento tem uma ação específica na indução do crescimento gengival. Uzel et al. (2001) verificaram diferenças de distribuição do Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo entre os três tipos de lesões gengivais e

que a fenitoína era a droga indutora de uma maior fibrose quando comparada com a ciclosporina e nifedipina.

1.4 ALTERAÇÕES CELULARES

Os fibroblastos exercem um papel central no desenvolvimento do crescimento gengival por serem as células responsáveis pela síntese e degradação das proteínas da matriz extracelular, além da produção de fatores de crescimento.

Durante muito tempo, o crescimento gengival induzido pela fenitoína foi denominado hiperplasia gengival dilantínica, até que estudos morfológicos concluíssem que não há hipertrofia nem hiperplasia celular (HASSELL et al., 1978, KATO et al., 2005; MARIANI et al., 1993; McGAW; PORTER, 1988; MORISAKI et al., 1993). No entanto, Hassell et al. (1982) observaram um aumento inicial e transitório no número de fibroblastos induzido pela fenitoína, após o qual, a relação matriz extracelular/ número de células voltou ao normal.

Um aumento no número de fibroblastos também foi observado em crescimentos gengivais induzidos pela ciclosporina (SPOLIDORIO et al., 2001) e que estava correlacionado com um aumento e posterior diminuição dos níveis de $TGF\beta_1$ (SPOLIDORIO et al., 2005).

O fato do crescimento gengival não ser induzido em todos os pacientes gerou a teoria de que há subpopulações de fibroblastos que respondem ou não aos medicamentos (HASSELL et al., 1982). Segundo essa teoria, pacientes que não desenvolvem o crescimento gengival não teriam a subpopulação responsável pelas modificações teciduais induzidas pelos medicamentos (McGAW; PORTER, 1988). Trabalhos *in vitro* mostraram comportamentos fenotípicos diferentes entre

fibroblastos provenientes de gengiva normal e de crescimentos gengivais (JAMES et al., 1998; HYLAND et al., 2003; McKEVITT; IRWIN, 1995).

A quantidade de células inflamatórias está intimamente relacionada à presença de fatores irritantes. A observação clínica de que o crescimento gengival desenvolve inicialmente e/ou é mais severo em áreas de acúmulo de placa bacteriana levou à crença de que a inflamação gengival seria essencial para o desenvolvimento da lesão (STAPLE et al., 1978). Embora a placa bacteriana aumente sua severidade, o crescimento gengival induzido pela ciclosporina também se desenvolve em pacientes cujo grau de higiene parece ser adequado (DALEY et al., 1986, PILATTI; SAMPAIO, 1997; PISANTY et al., 1988) e nos quais os aspectos histológicos não mostraram sinais de infiltração de células inflamatórias (MARIANI et al., 1993). Da mesma forma, a placa bacteriana aumenta a severidade do crescimento gengival induzido pela fenitoína, mas não é um requisito para seu desenvolvimento (MORISAKI et al., 1990). A qualidade do agente irritante da gengiva, mais que a sua quantidade, parece estar relacionada com a severidade da lesão (STAPLE et al., 1978).

2 MATERIAL E MÉTODO

O presente trabalho foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP (Protocolo 41/03 – Anexo I). Foram utilizados doze macacos-prego (*Cebus apella*) machos, provenientes do Núcleo de Procriação de Macacos-Prego da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, alimentados com frutas, ração, legumes cozidos, iogurte, ovos e água à vontade, com ventilação e luz naturais durante o dia e aquecimento noturno durante o inverno.

O grupo controle foi constituído por amostras de gengiva inserida obtidas da área de canino superior direito. Para tanto, os animais foram sedados com éter e pesados para a posterior anestesia intraperitoneal com Thionembital na dose de 30 mg/kg de peso corporal. Após a anti-sepsia com solução aquosa de clorexidina a 0,12%, a gengiva da área da biópsia foi avaliada e classificada quanto ao sangramento de sulco gengival, segundo os critérios de MÜHLEMANN & MAZOR, e índice gengival de LÖE & SILNESS (Anexo II). Em seguida, foi realizada uma anestesia terminal infiltrativa com mepivacaína a 2% associada a epinefrina a 1:100.000 (DFL®). A região cirúrgica foi delimitada por incisões verticais que abrangiam as papilas gengivais mesial e distal da gengiva vestibular até o limite muco-gengival. A parte mesial da gengiva foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido, enquanto que a distal foi fixada em solução tamponada de formol a 10%. A área operada foi protegida com cimento cirúrgico sem eugenol.

Após o período de uma semana, os animais foram divididos em três grupos, constituídos por três animais subadultos e um adulto. A classificação da faixa

etária seguiu os critérios de Gilmore (FREESE; OPPENHEIMER, 1981). Os animais do primeiro grupo receberam ciclosporina na forma de xarope (Sandimmun Neoral) na dose de 5 mg/kg de peso corporal. O segundo grupo recebeu fenitoína na dose de 7,5 mg/kg. Após o período de uma semana, tanto a dose de ciclosporina quanto da fenitoína passaram para 15 mg/kg. O terceiro grupo recebeu nifedipina na dose de 40 mg/kg durante todo o período experimental (Anexo IX). Todos os medicamentos foram administrados por via oral, em dose única diária.

Após 52 dias, dois animais de cada grupo foram sedados com éter e anestesiados com cloridrato de cetamina (Cristália®) na dose de 10 mg/kg para a obtenção de amostras de gengiva inserida da área de canino superior esquerdo. O período experimental foi concluído aos 120 dias, com a obtenção de amostras de gengiva inserida da área de caninos superiores do lado esquerdo dos animais não submetidos à biópsia aos 52 dias. Todos os procedimentos cirúrgicos descritos para a biópsia inicial foram realizados aos 52 e 120 dias.

2.1 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

As peças fixadas em solução tamponada de formol a 10% foram processadas para a inclusão em parafina. Os cortes foram obtidos no sentido transversal vestibulo-lingual, com 6 µm de espessura e submetidos à coloração com hematoxilina e eosina. Para análise de fibras colágenas, procedeu-se à técnica do vermelho picrosirius (Anexo IV). A reação imunoistoquímica para evidênciação de colágeno do tipo IV foi realizada em cortes com 3 µm de espessura (ANEXO III).

Os cortes corados pela técnica do vermelho picrosirius foram analisados em microscópio de luz polarizada (Carl Zeiss®). Foram consideradas três

áreas distintas de tecido conjuntivo: subjacente ao epitélio sulcular (TCS); associada ao epitélio oral (TCO), e a terceira mais profunda, denominada de intermediária (TCI) (Figura 2D). Imagens obtidas com um aumento de 200x foram digitalizadas para permitir a análise da área ocupada por fibras verdes, amarelas, alaranjadas e vermelhas, com o uso do programa QWin (Leica®). Para tanto, foram delineadas áreas de 600.000 μm^2 . Os dados foram transformados em valores percentuais .

2.2 RT-PCR

As peças cirúrgicas congeladas foram maceradas imersas em nitrogênio líquido para a extração de mRNA total (ANEXO V), com o uso de TRIzol (Invitrogen Life Technologies™, Carlsbad, CA, EUA). No final desta fase, realizou-se tratamento com DNAase com o intuito de controlar uma eventual contaminação com DNA genômico. A transcrição reversa para a obtenção de cDNA foi realizada com o uso do kit Superscript II (Invitrogen Life Technologies™, Carlsbad, CA, EUA), conforme as instruções do fabricante, a partir de 750 ng de mRNA de cada amostra (ANEXO VI). Para tanto, as amostras obtidas foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis).

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação da MMP-1, MMP-2, colágeno do tipo I (Col1 α 1) e betaglobina (Invitrogen Life Technologies™, Carlsbad, CA, EUA) foram desenhados com o auxílio dos programas Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research) e ClustalW (European Bioinformatics Institute), priorizando-se seqüências conservadas entre as espécies de mamíferos em que tais genes já foram caracterizados. A amplificação do gene da

betaglobina, considerado constitutivo, foi utilizada como controle interno das reações de forma a permitir a análise semiquantitativa.

As validações do PCR semiquantitativo para a MMP-2 e colágeno do tipo I foram realizadas com a amplificação simultânea do gene alvo e o constitutivo betaglobina. O oligonucleotídeo iniciador para MMP-1 mostrou-se incompatível com a amplificação simultânea com o do gene constitutivo, motivo pelo qual foi amplificado separadamente. O número de ciclos ideal para a amplificação de cada gene alvo foi definido como aquele em que ocorria aumento linear de expressão gênica (ANEXO VII). A mistura de amplificação foi composta por 500 ng de cDNA, 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), 1,9 mM de dNTP (deoxyribonucleoside 5'- triphosphates – dATP, dCTP, dGTP e dTTP – Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), 2,5 µl de tampão PCR 10x (10 mM de Tris-HCl pH 8, e 50 mM de KCl - Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies®, Brasil) em reações duplex e 0,5 U em reações simplex, água ultrapura qsp (Invitrogen Life Technologies™, Carlsbad, CA, EUA) para um volume final de 25 µl. O controle negativo foi composto por mistura de amplificação e água ultrapura. As características e quantidade de cada oligonucleotídeo iniciador adicionado à solução de amplificação são mostradas na Tabela 1.

Os ciclos de amplificação consistiram de uma fase inicial de desnaturação (5 minutos a 94°C), seguida por ciclos de desnaturação (45 segundos a 94°C), anelamento (40 segundos) e extensão (40 segundos a 72°C), seguidos por 7 minutos a 72°C para extensão final. A temperatura de anelamento e o número de ciclos usados para cada oligonucleotídeo iniciador estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1- Características dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes da MMP-1, MMP-2, Col1 α 1 e betaglobina.

Gene	Oligonucleotídeo iniciador	Fragmento (pb)	Concentração utilizada	Temperatura de anelamento	Número de ciclos
MMP-1	S: 5'GTGATGAAGCAGCCCAGATG3'	308	12 pmol	56°C	32
	A: 5'CCTGGTTGAAAAGCATGAGC3'				
MMP-2	S: 5'GGAGGAGAAGGCTGTGTTCTT3'	347	10 pmol	61°C	27
	A: 5'TTTGGTTCTCCAGCTTCAGG3'				
Col1α	S: 5'CCTGGAATGAAGGGACACAG3'	209	1,5 pmol	60°C	29
	A: 5'GCAGCACCAGTAGCACCATC3'				
Beta-globin	S: 5' ACTGCTGAAGAGAAATCTGC3'	130	3 pmol	60°C	29
	A: 5' CCCCCAAGGAGTCAAAGAAC3'				
	A: 5' GAGTCAGGCCATCACTAAAG	220			

S= *sense*, A= *antisense*, pb= pares de bases

Todas as reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em duplicata, em eventos separados, com ensaios que incluíram os grupos tratados e controle. Os seus produtos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% durante três horas, sob voltagem constante de 100 volts. A evidenciação das bandas foi realizada em solução de SYBR Green 1/10000 de tampão TBE. As imagens dos géis foram capturadas em triplicata com o uso do programa Kodak Digital Science 1D, que também permitiu a análise da intensidade média das bandas. O valor referente à intensidade da banda do gene alvo foi dividido pelo do gene constitutivo. Para a análise dos resultados, calculou-se a média dos dados obtidos.

Os produtos do PCR foram seqüenciados para confirmação da natureza dos fragmentos amplificados. Para tanto, utilizou-se o kit Dynamic ET® Terminator (GE- Healthcare- UK Limited), conforme instruções do fabricante. As

seqüências foram produzidas em equipamento MegaBace 1000 (GE- Healthcare- UK Limited) e submetidas à análise.

Testes estatísticos não foram aplicados devido ao número reduzido de animais em cada grupo. Os valores numéricos das médias dos grupos estão representados nas Figuras 4 e 5.

3 RESULTADOS

3.1 OBSERVAÇÕES CLÍNICAS

O período experimental transcorreu sem complicações. A grande maioria dos animais manteve o peso. Em alguns, houve o aumento ou a diminuição, sem, no entanto, haver um padrão que pudesse ser atribuído ao medicamento administrado. Não foram observadas alterações comportamentais atribuíveis à administração dos medicamentos ou possíveis efeitos colaterais.

Clinicamente, constatou-se aumento gengival em todos os animais subadultos, em graus variados de severidade (Figuras 1C e 2E). Não foram observados padrões de severidade que pudessem ser correlacionados aos diferentes medicamentos ou à presença de cálculo periodontal e placa bacteriana. Nos animais adultos, a faixa de gengiva inserida era mais delgada quando comparada com a dos mais jovens e as alterações induzidas pelos medicamentos não foram clinicamente perceptíveis (Figuras 1E e 2F). As alterações em todos animais foram mais evidentes na gengiva dos dentes anteriores.

3.2 GRUPO CONTROLE

HEMATOXILINA E EOSINA, COLÁGENO TIPO IV

Subjacente ao tecido conjuntivo frouxo da camada papilar da lâmina própria da gengiva, observou-se uma faixa ampla de tecido conjuntivo denso, cujos feixes de fibras colágenas estavam dispostos em direções variáveis (TCO). A camada mais profunda da lâmina própria (TCI) era constituída por tecido conjuntivo frouxo, associado a vasos sangüíneos mais calibrosos (Figura 3A). Essa camada era mais

evidente nas amostras de maior volume. O tecido conjuntivo subjacente ao epitélio sulcular (TCS) apresentava graus variáveis de infiltração inflamatória do tipo crônico, associado a um número maior de vasos sangüíneos.

VERMELHO PICROSIRIUS, RT-PCR

A coloração pela técnica de vermelho picrosirius permitiu evidenciar um predomínio de fibras colágenas maduras, distribuídas na forma de feixes de diâmetros variáveis (Figuras 1B, 1F e 2D). No entanto, os feixes de fibras colágenas eram mais espessos na camada TCO. A camada intermediária era composta por feixes dispostos de forma mais esparsa em relação à camada TCO. Nos animais mais velhos, essa diferença não era discernível (Figura 1F). Quando presentes, as fibras com a cor verde eram delgadas, com predomínio nas camadas TCI e TCS.

A expressão do gene da MMP-1 mostrou variação interindividual, não correlacionada aos índices de MÜHLEMANN & MAZOR e de LÖE & SILNESS, em nenhum tempo experimental. Em algumas imagens digitalizadas, a banda correspondente à expressão desse gene não foi detectada, a despeito da expressão do gene constitutivo.

As expressões dos genes da MMP-2 e do Col1 α 1 foram mais uniformes entre as amostras e, de forma semelhante ao da MMP-1, não correlacionadas com os índices gengivais.

3.3 52 DIAS

HEMATOXILINA E EOSINA, COLÁGENO TIPO IV

Não foram observadas alterações no padrão de distribuição de fibras em nenhum grupo. A evidenciação do colágeno IV permitiu a observação de que a

concentração central de vasos mais calibrosos não era tão nítida como no grupo controle (Figura 3B). Havia uma maior distribuição de vasos nas áreas TCO, TCI e TCS em todos os animais.

VERMELHO PICROSIRIUS, RT-PCR

Os animais do grupo da ciclosporina e da fenitoína apresentaram aumento de fibras verdes, que apesar de terem uma distribuição mais difusa, estavam em maior quantidade nas áreas TCI e TCS. As fibras da camada TCI eram delgadas, ao contrário daquelas da camada TCO. Houve predomínio de fibras amarelas e verdes, tanto nos animais jovens quanto nos mais velhos (Figura 2B, 5A e 5B). As alterações descritas foram acompanhadas por uma tendência à diminuição da expressão dos genes do colágeno, MMP-1 e MMP-2 (Figura 6A).

No grupo da nifedipina, além do predomínio de fibras novas, observou-se um aumento da densidade de fibras (Figura 2F). Paralelamente, verificou-se uma tendência ao aumento da expressão do gene da MMP-2, enquanto que a do Col1 α 1 permaneceu constante (Figura 5C).

3.4 120 DIAS

HEMATOXILINA E EOSINA, COLÁGENO TIPO IV

No grupo da fenitoína se observou uma trama de tecido conjuntivo denso composto por fibras colágenas espessas e células com núcleo condensado. Algumas células inflamatórias crônicas foram observadas de forma esparsa no tecido e, em alguns espécimes, concentradas na camada TCS. A distinção entre as camadas TCO e TCI não era evidente.

No grupo da ciclosporina, a distinção entre a camada TCO e TCI também não era nítida em nenhum espécime. Células com núcleo condensado tinham uma distribuição ampla e uniforme e em quantidade variável entre as amostras.

A lâmina própria era composta por tecido conjuntivo denso no grupo da nifedipina. Células com núcleo condensado eram distribuídas de forma uniforme e em grande número. Não foi possível a distinção entre as camadas TCO e TCI.

O padrão de distribuição de vasos sanguíneos foi semelhante em todos os grupos, sem qualquer característica peculiar que pudesse ser atribuída ao medicamento. Pequenos vasos sanguíneos foram observados na lâmina própria, enquanto que os de maior calibre encontravam-se principalmente na área central da lâmina própria. Em alguns espécimes observou-se um maior número de vasos sanguíneos na região TCS.

VERMELHO PICROSIRIUS, RT-PCR

Os cortes pertencentes ao grupo da fenitoína mostraram um predomínio de fibras amarelas espessas, distribuídas de forma uniforme nas três áreas analisadas. Em um espécime foi possível a distinção entre as camadas TCO e TCI, que mantinham características de distribuição de fibras semelhantes às do grupo controle. Os dados obtidos do RT-PCR sugeriram que ocorreu um aumento da expressão de todos os genes analisados em relação ao período de 52 dias.

No grupo da ciclosporina observou-se um aumento da espessura das fibras, o que tornava difícil a distinção entre as camadas TCO e TCI (Figura 1D). A expressão dos genes do colágeno e da MMP-2 permaneceu nos mesmos níveis do período de 52 dias, embora a da MMP-1 tenha mostrado tendência de aumento.

As mesmas características histológicas do grupo da ciclosporina foram observadas nos espécimes pertencentes ao grupo da nifedipina. No entanto, os dados obtidos da expressão do Col1 α 1 e da MMP-2 sugerem uma diminuição em relação ao período anterior, e um aumento da MMP-1.

3.5 SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DO RT-PCR

O seqüenciamento dos produtos do RT-PCR confirmou a natureza dos fragmentos do Col1 α 1, MMP-1 e MMP-2. A análise comparativa das seqüências de mRNA de humanos e de macacos-prego, tanto da MMP-1 quanto da MMP-2, mostrou homologia de 96%. Os oligonucleotídeos iniciadores da MMP-1 também foram usados para amplificar DNA humano e desse macaco. Os produtos resultantes apresentaram homologia de 99%. O mRNA do Col1 α 1 do macaco-prego apresentou 91% de homologia em relação à seqüência do humano. A análise de homologia das seqüências obtidas é mostrada no Anexo VIII.

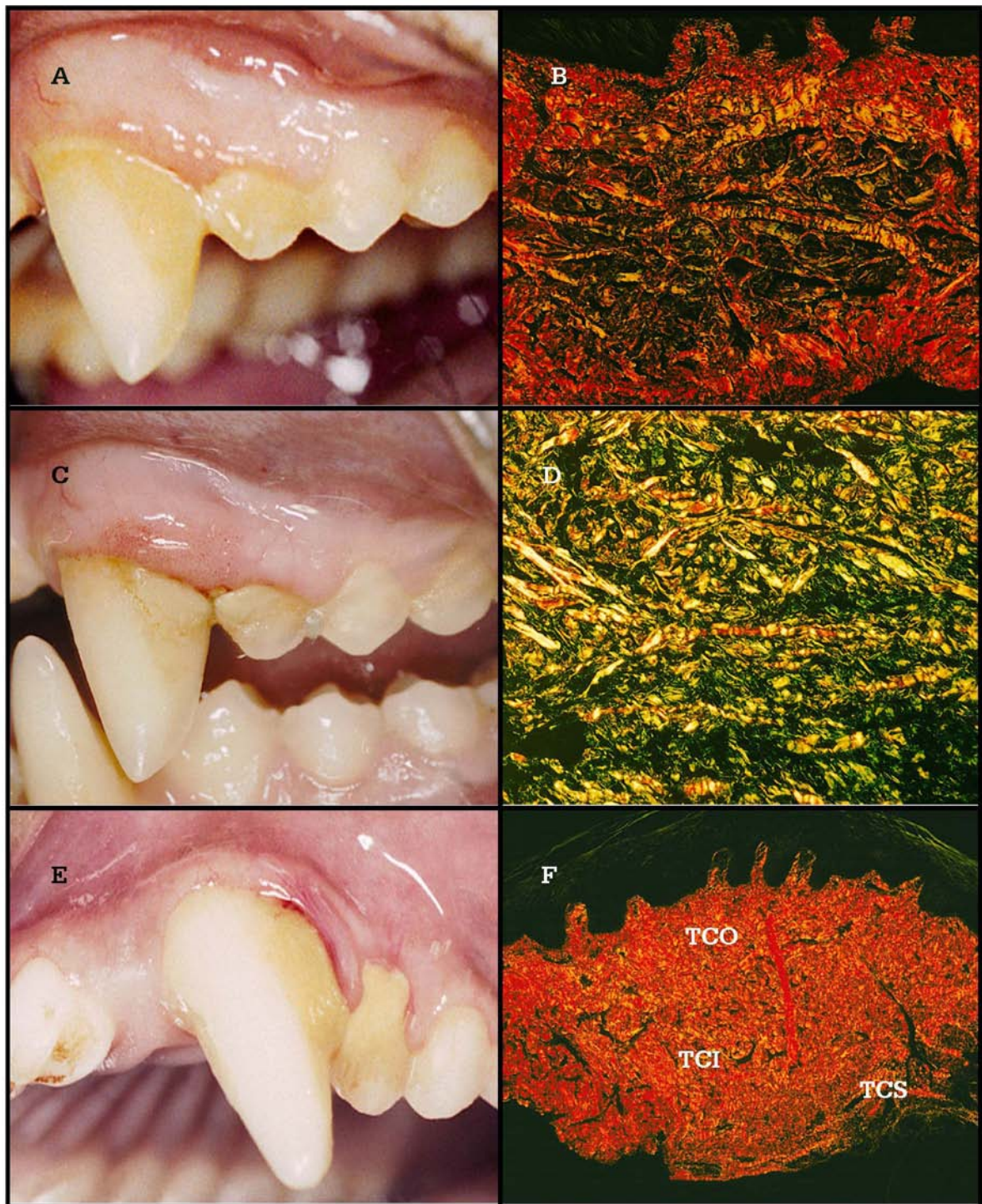


Figura 1. Aspectos clínicos e respectivas fotomicrografias de gengiva de macacos. Cortes transversais corados com vermelho picrosirius. (A) Animal 3, sub-adulto, antes do tratamento com ciclosporina. (B) Fotomicrografia de biópsia gengival no animal da figura A - predomínio de fibras vermelhas e alaranjadas. Aumento original de 200x. (C) Crescimento gengival observado no animal 3, após 120 dias de tratamento com ciclosporina. (D) Fotomicrografia de biópsia gengival no animal da figura C - predomínio de fibras verdes e amarelas. Aumento original de 200x. (E) Animal 10, adulto, antes do tratamento com fenitoína. (F) Fotomicrografia de biópsia gengival no animal da figura E - predomínio de fibras vermelhas e alaranjadas. Indicação das camadas TCO, TCI e TCS. Aumento original de 100x.

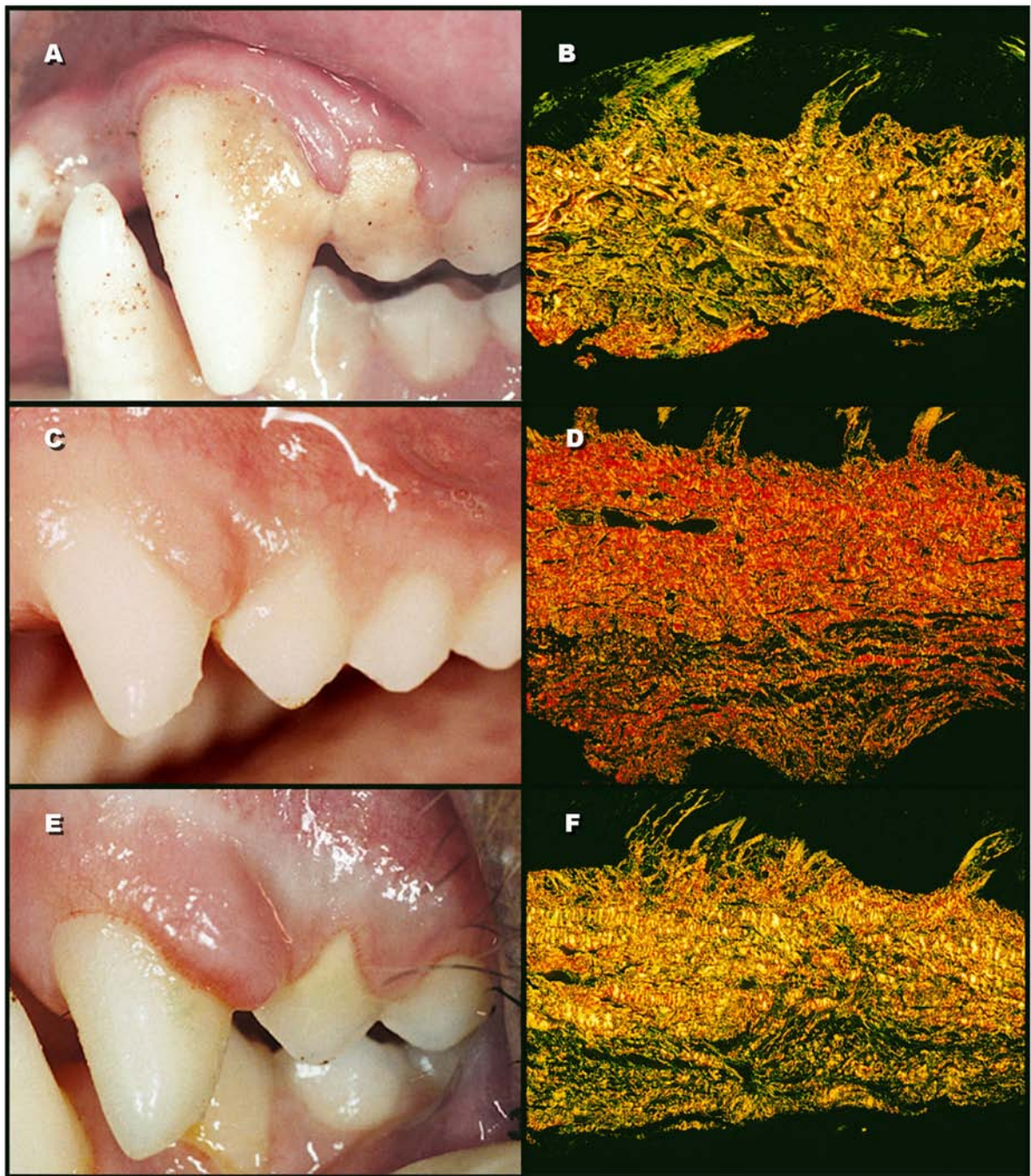


Figura 2. Aspectos clínicos e respectivas fotomicrografias de gengiva de macacos. Cortes transversais corados com vermelho picrosirius. (A) Animal 10, após 52 dias de tratamento com fenitoína. Ausência de sinais clínicos de crescimento gengival. (B) Fotomicrografia de biópsia gengival no animal da figura A - predomínio de fibras verdes e amarelas. Aumento original de 100x. (C) Animal 12, sub-adulto, antes do tratamento com nifedipina. (D) Fotomicrografia de biópsia gengival no animal da figura C - predomínio de fibras vermelhas e alaranjadas. Aumento original de 100x. (E) Crescimento gengival observado no animal 12, após 52 dias de tratamento com nifedipina (F) Fotomicrografia de biópsia gengival no animal da figura E - predomínio de fibras amarelas e verdes. Aumento original de 100x.

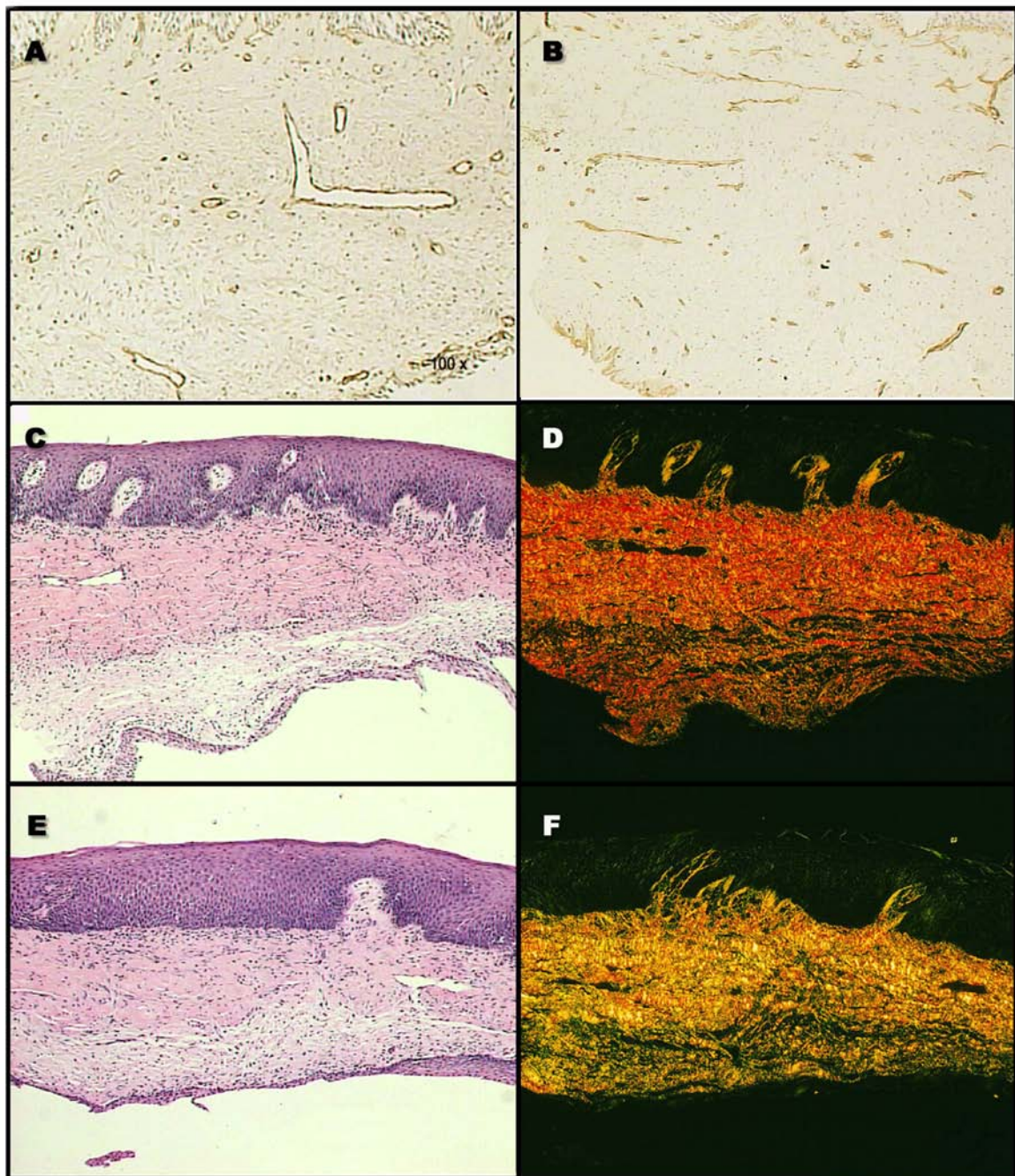


Figura 3. Fotomicrografias de cortes transversais de gengiva de macacos. (A) Fotomicrografia de biópsia gengival no animal 12, antes do tratamento com nifedipina. Marcação imunoistoquímica para colágeno IV. Aumento original de 100x. (B) Fotomicrografia de biópsia gengival no animal 12, após 52 dias de tratamento com nifedipina. Marcação imunoistoquímica para colágeno IV. Aumento original de 100x. (C) Animal 8, antes do tratamento com fenitoína. HE. Aumento original de 100x. (D) Fotomicrografia da mesma amostra da figura C, corada pela técnica do vermelho picrosirius. Predomínio de fibras vermelhas e alaranjadas. Aumento original de 100x. (E) Animal 8, após 52 dias de tratamento com fenitoína. HE. Aumento original de 100x. (F) Fotomicrografia da mesma amostra da figura E corada pela técnica do vermelho picrosirius. Predomínio de fibras amarelas e verdes. Aumento original de 100x.

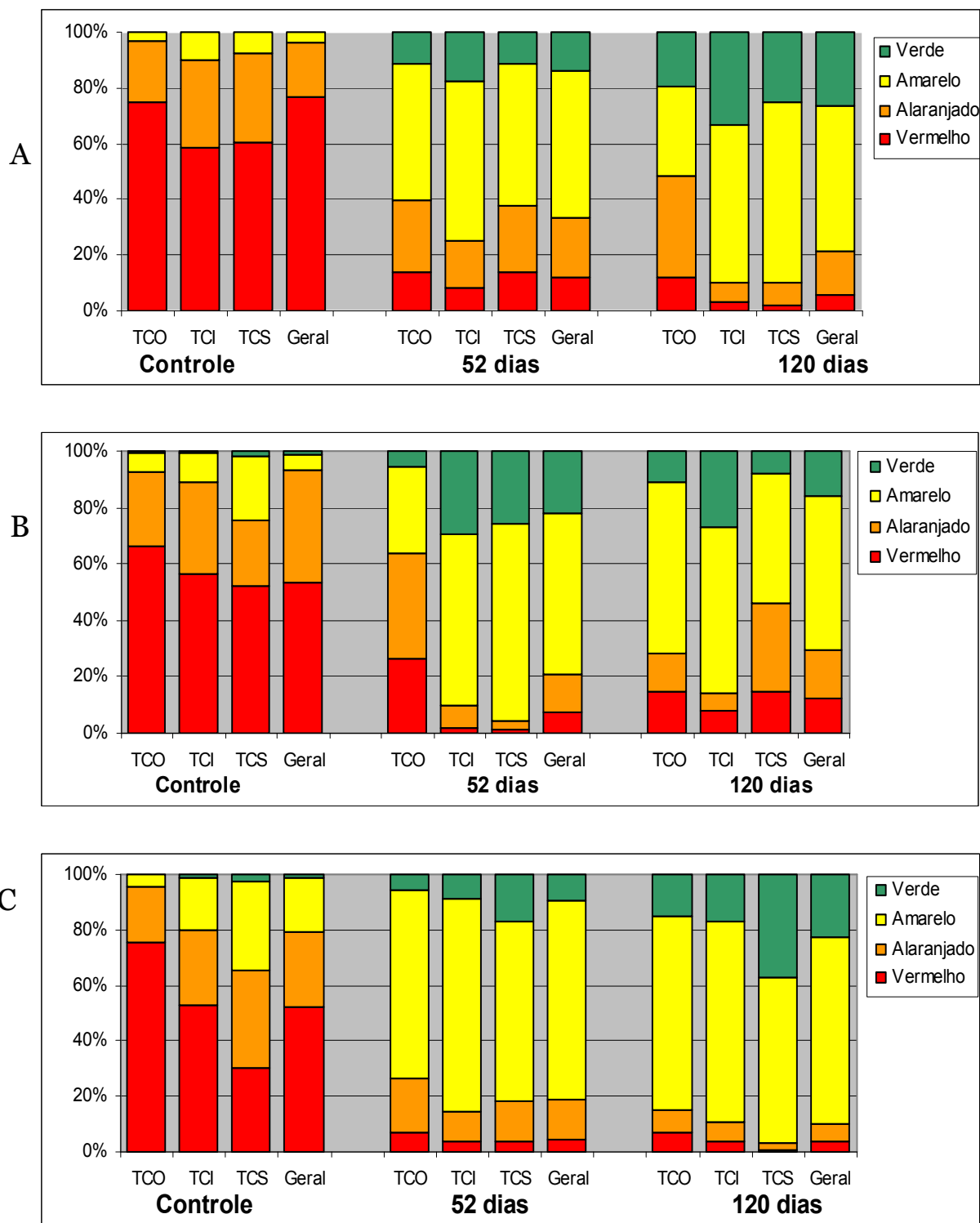


Figura 4. Distribuição das porcentagens das áreas ocupadas pelas diferentes cores após a coloração pelo vermelho picrosirius. Grupo tratado com Ciclosporina (A), Fenitoína (B) e Nifedipina (C).

TCO= Tecido conjuntivo associado ao epitélio oral; TCI= Tecido conjuntivo localizado na camada profunda da lâmina própria; TCS= Tecido conjuntivo associado ao epitélio sulcular

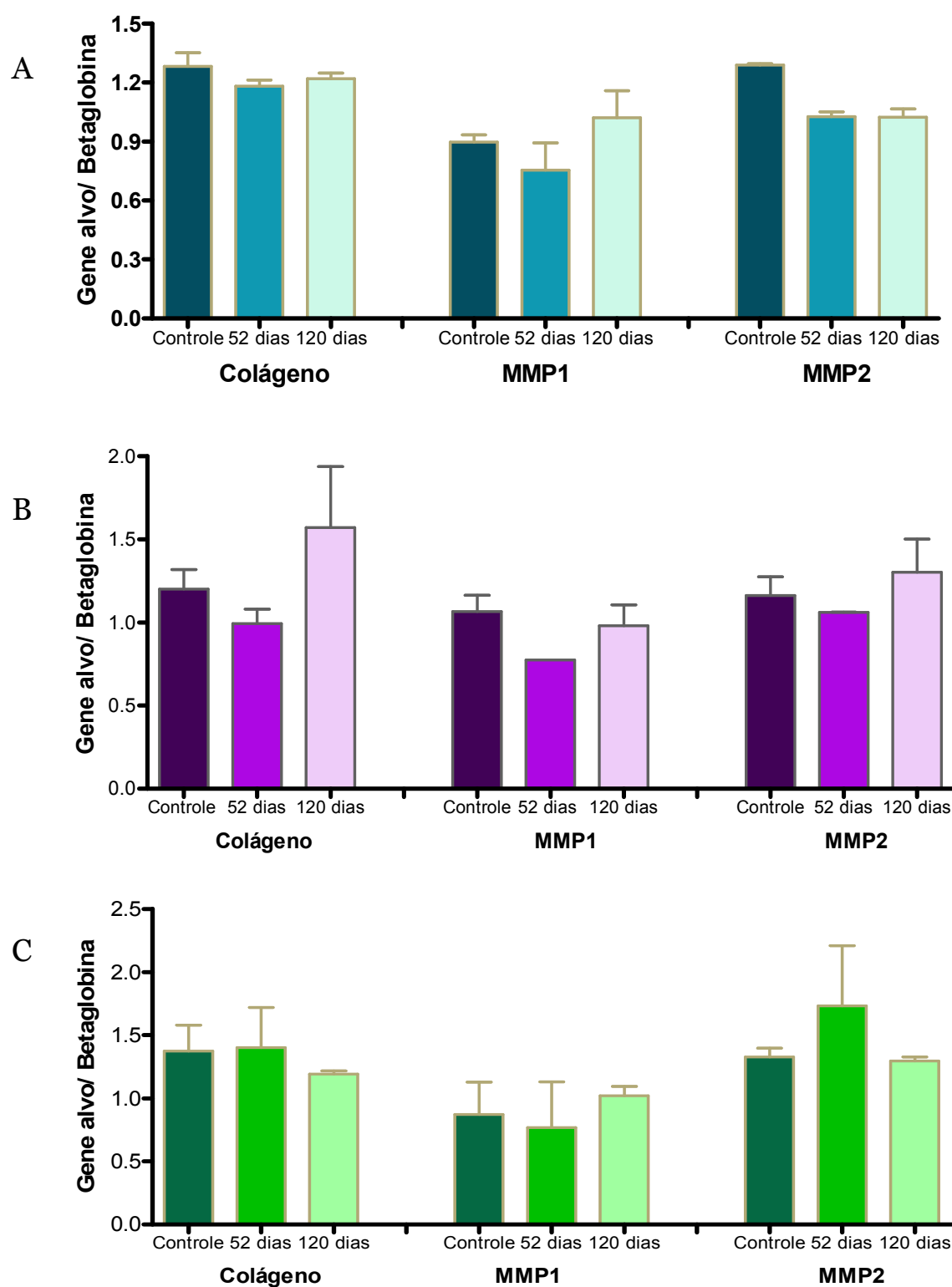


Figura 5. Efeito da Ciclosporina (A), Fenitoína (B) e Nifedipina (C) sobre a expressão do gene do colágeno do tipo 1, MMP-1 e MMP-2. Valores relativos médios de mRNA (Média+ Desvio Padrão).

4 DISCUSSÃO

Nos trabalhos descritos na literatura consultada, constata-se que há ampla variação no percentual de prevalência do crescimento excessivo da gengiva induzido por medicamentos. Essa prevalência varia de 13 a 81% para os casos induzidos pela ciclosporina, enquanto que pela nifedipina e fenitoína, há uma variação de 14,7 a 83% e 0 a 100%, respectivamente (MARSHALL; BARTOLD, 1999). A ausência de alterações clínicas em alguns indivíduos gerou o conceito de pacientes não suscetíveis. Segundo essa teoria, existem subpopulações de fibroblastos que respondem de forma heterogênea às drogas que induzem crescimento excessivo da gengiva (MCKEVITT; IRWIN, 1995; THOMASON et al., 1998). Acredita-se que pacientes que não desenvolvem a lesão não possuem a subpopulação de fibroblastos sensíveis aos medicamentos.

A dificuldade em se estabelecer parâmetros objetivos que orientem o diagnóstico clínico pode ser apontada como uma das principais causas das diferenças nos índices de prevalência do crescimento gengival induzido por medicamentos. Associada à subjetividade do diagnóstico, as alterações morfológicas não são evidentes quando os cortes histológicos são corados apenas com hematoxilina e eosina (Figura 3C e 3E). No entanto, os dados obtidos com a metodologia empregada no presente trabalho indicaram que os medicamentos estudados sempre ocasionam modificações na matriz extracelular (Figura 3D e 3F). Provavelmente a diferença entre pacientes suscetíveis e não suscetíveis seja apenas uma questão de graus diferentes de intensidade em eventos moleculares que ocorrem em todos os casos. A dose necessária para o desenvolvimento da lesão é outro fator a ser considerado. É possível que todos os pacientes desenvolvam crescimento excessivo da gengiva a

partir de uma certa dose do medicamento, já que Daley et al. (1986) observaram que todos os que tomaram doses de ciclosporina acima de 700 mg por dia desenvolveram a lesão em algum grau. Entretanto, os três medicamentos estudados nos macacos são prescritos para os pacientes por um período muito longo, mas dificilmente mantidos em doses altas.

A idade é um outro fator modificante de importância a ser considerado (ADDY et al, 1983; DALEY et al., 1986; ISHIDA et al, 1995; NISHIKAWA et al., 1996). Tal assertiva foi comprovada, uma vez que os macacos adultos não apresentaram evidências clínicas de crescimento gengival, a despeito das alterações dos aspectos histológicos evidenciados pelo vermelho picrosirius (Figura 2A e 2B).

A técnica de coloração pelo vermelho picrosirius tem sido sugerida para o estudo de alterações temporais da organização de fibras colágenas. Sabe-se que sua espessura aumenta com o tempo, a demanda funcional e a idade (RICH; WHITTAKER, 2005). Esse aumento na espessura das fibras determina uma variação do verde para o amarelo, alaranjado e vermelho quando coradas com vermelho picrosirius e analisadas em microscópio de luz polarizada (DAYAN et al., 1989; MONTES; JUNQUEIRA, 1991; RICH; WHITTAKER, 2005). Não há um consenso, entretanto, se a cor verde representa formas imaturas de colágeno do tipo I ou fibras de colágeno do tipo III. Alguns autores consideram o tipo III como uma forma imatura de colágeno e correlacionam sua presença a uma maior capacidade de remodelação tecidual. (CHAVRIER et al., 1984; MILLER et al., 2002; SCULEAN et al. 2002; WERFULLY et al. 2002). Desta forma, independente da natureza do colágeno evidenciado com a cor verde, parece ser lícito associá-lo a áreas de reparo tecidual.

A análise dos resultados obtidos evidenciou um aumento de fibras colágenas imaturas, induzido por todos os medicamentos estudados, à semelhança dos dados obtidos por Dayan et al. (1993) em crescimento gengival associado à ingestão de oxidipina. No entanto, as modificações teciduais não ocorreram de forma uniforme na gengiva dos macacos. A região central do tecido conjuntivo parece ser o principal foco das alterações, já que foi a que apresentou percentagens maiores de área ocupada por fibras evidenciadas com a cor verde pelo vermelho picrosirius aos 52 e 120 dias, com exceção, entretanto, do grupo da nifedipina (Figura 4). Em condições de normalidade, essa região foi descrita como sendo uma área de maior concentração de metaloproteinases (MEIKLE et al., 1994) e de monócitos em processos de maturação e diferenciação (NURMENNIEMI et al., 2002). Uzel et al. (2001) descreveram distribuições diferentes de marcação imunoistoquímica para o TGF- β , células endoteliais e fator de crescimento de tecido conjuntivo, em amostras de gengiva com crescimentos excessivos induzidos por ciclosporina, nifedipina e fenitoína. Os autores observaram uma marcação mais forte para TGF- β , considerado um iniciador do processo de reparo tecidual, na área central das amostras dos grupos da nifedipina e fenitoína.

Embora as áreas próximas ao epitélio também tenham sido descritas como sendo sedes de reparo tecidual, quer seja pela maior concentração de colágeno do tipo III (CHAVRIER et al., 1984; CHO et al., 1984; NARAYANAN et al., 1985), de metaloproteinases (MEIKLE et al., 1994; WOOLEY; DAVIES, 1981,) ou de células de reparo (NARES et al., 1996; NURMENNIEMI et al., 2002; PERNU; KNUUTTLA, 2001; PLEMONS et al., 1996), não foram observadas características morfológicas peculiares em tais áreas através da metodologia utilizada neste experimento.

Romanos et al. (1993a) observaram que a nifedipina, ciclosporina e a difenildantoína ocasionam distribuições características de colágeno dos tipos IV, V e VI. O colágeno do tipo IV é encontrado nas membranas basal e endotelial e pode servir como um indicador da proliferação epitelial e vascular. Apesar das mudanças na distribuição de vasos sangüíneos e da hiperplasia epitelial observadas no presente experimento, não foi possível detectar padrões característicos a cada medicamento através da metodologia empregada.

Não há um consenso se o crescimento gengival induzido por medicamentos ocorre às custas do aumento de fibras colágenas ou de glicosaminoglicanas. Esse aumento pode ocorrer tanto às custas de síntese aumentada ou pela diminuição de sua degradação. É interessante observar que também tem sido descrita a diminuição na expressão dos genes de várias enzimas da família das metaloproteinases. Considerando que as metaloproteinases, em conjunto, podem degradar todos os componentes da matriz extracelular (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; LODISH et al., 2000), pode-se inferir que o metabolismo não só das fibras colágenas e das glicosaminoglicanas pode sofrer alterações em crescimentos gengivais induzidos por medicamentos, mas também todos os substratos de outras metaloproteinases.

O fibroblasto tem sido o principal foco de estudos sobre crescimento excessivo de gengiva induzido por medicamentos, principalmente através de pesquisas com cultura de células. No entanto, já foi demonstrado que a fenitoína (IACOPINO et al., 1997), a nifedipina (PERNU, KNUUTTILA, 2001) e a ciclosporina (NARES et al., 1996; PLEMONS et al., 1996; NURMENNIEMI et al., 2002) também induzem a modificações nas respostas biológicas de macrófagos. Essas células têm sido consideradas mediadoras importantes no processo de remodelação e reparo

tecidual (NURMENNIEMI et al., 2002). Estes dados indicam que os mecanismos de indução ao crescimento gengival são complexos, envolvem interações de vários fatores de crescimento e citocinas, os quais modulam eventos biológicos de diferentes tipos celulares. A conseqüente reação em cascata cria um microambiente favorável às modificações características do crescimento gengival. Desta forma, padrões de expressão genética observados *in vitro* podem diferir substancialmente daqueles observados *in vivo*. Além do mais, há relatos de heterogeneidade na resposta *in vitro* aos medicamentos sob as mesmas condições de estudo (JAMES et al., 1998; TIPTON; DABBOUS, 1986). Metaloproteinases expressas por muitas células em cultura podem ter uma expressão limitada *in vivo* (BIRKEDAL-HANSEN, 1995). A alteração da produção de enzimas *in vitro* pode ser um reflexo da exposição das células a um novo ambiente, indução a uma forma de reparo após a colocação das células em cultura ou perda de componentes tissulares normais (WOOLLEY & DAVIES, 1981). Talvez esses dados expliquem os resultados obtidos por Yamada et al. (2000), que não observaram uma menor marcação imunoistoquímica para MMP-1 em amostras de gengiva com crescimentos excessivos induzidos pela fenitoína, embora constatassem *in vitro* uma diminuição da expressão dessa enzima. Por outro lado, outros fatores modificantes da expressão genética das MMPs devem ser considerados nos trabalhos *in vivo*, como a presença de inflamação em diferentes graus.

A MMP-1 tem sido correlacionada à destruição tecidual causada pela doença periodontal (GAGLIANO et al., 2004; KUBOTA et al., 1996). O controle de placa bacteriana não foi realizado devido às dificuldades impostas pelo manejo do modelo experimental. Para eliminar a interferência da inflamação e variações individuais na resposta aos fatores irritantes, optou-se por um estudo longitudinal, no qual a amostra controle era do próprio macaco antes do tratamento. Sob essas

condições, não foi observada uma correlação entre os parâmetros clínicos de avaliação do grau de inflamação gengival e a expressão da MMP-1 e da MMP-2.

Gagliano et al. (2004) atribuíram a variação interindividual nos níveis das metaloproteinases à diversidade de fenótipos entre subgrupos de fibroblastos. Hyland et al. (2003) sugerem que as diferenças fenotípicas entre as diversas subpopulações de fibroblastos podem ser atribuídas ao polimorfismo da região promotora do gene que expressa a MMP-1. Segundo esses últimos autores, a ciclosporina poderia estimular a proliferação seletiva de fibroblastos que produzem uma menor quantidade de MMP-1, resultando em uma população fenotipicamente diferente daquela de gengiva normal. Da mesma forma, a nifedipina também parece selecionar uma subpopulação de fibroblastos (MCKEVITT; IRWIN, 1995). Esses dados estão de acordo com os obtidos por Thomason et al. (1998), que observaram uma maior quantidade de fibroblastos não positivos para a MMP-1 em crescimentos gengivais em relação ao grupo controle, através de técnicas imunoistoquímicas.

Os dados ora obtidos indicam que a idade também deve ser considerada um fator modificante, já que animais mais velhos apresentaram uma menor expressão do gene da MMP-1. Os genes das metaloproteinases são pouco expressos em tecidos normais de indivíduos adultos, embora seus níveis possam aumentar durante o reparo tecidual, inflamação, invasão tumoral e metástases (BIRKEDAL-HANSEN, 1995).

Uma grande variabilidade na expressão do gene da MMP-1 foi observada entre as amostras deste experimento. Os valores obtidos aos 52 dias sugerem que ocorreu uma diminuição da expressão do gene da MMP-1 em todos os grupos, enquanto que aos 120 dias, um aumento desses valores. Esse aumento ocorreu paralelamente a uma maior densidade de fibras colágenas, conforme se

observou histologicamente. Se a expressão do gene da MMP-1 realmente estiver correlacionada com o reparo de tecidos periodontais, conforme afirmaram Romanelli et al. (1999), pode-se inferir que o desenvolvimento do crescimento gengival induzido por medicamentos deve envolver mecanismos semelhantes aos de remodelação ou reparo tecidual.

As expressões dos genes da MMP-2 e do colágeno do tipo I não mostraram um padrão de expressão uniforme entre os medicamentos estudados (Figura 5). No entanto, os dados obtidos no grupo da fenitoína sugerem um aumento diferenciado em torno de 36% aos 120 dias em relação ao período anterior. Histologicamente, a fenitoína foi o medicamento que induziu uma maior fibrose. Esses dados são condizentes com os obtidos por Uzel et al. (2001), que atribuíram este fato à maior concentração do Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo no grupo da fenitoína, quando comparada com a ciclosporina e nifedipina

Cabe ressaltar que apenas uma diminuição na degradação das fibras colágenas do tipo I, ocasionada pela diminuição da expressão das MMPs, não seria *per se* suficiente para ocasionar o crescimento gengival observado. Para tanto, seria necessário que a expressão do colágeno se mantivesse em níveis próximos aos normais ou mesmo, em níveis mais altos.

Não foi possível estabelecer uma correlação entre os níveis de expressão dos genes da MMP-2 e do colágeno e as modificações observadas histologicamente. É provável que o quadro histológico seja o resultado de um padrão de expressão genética que ocorreu na gengiva em uma fase anterior. De qualquer forma, a alteração na expressão dos genes analisados através dos níveis de mRNA, não pode ser interpretada necessariamente em mudança proporcional no tecido. Da

expressão do gene até a presença da proteína no meio extracelular, há vários mecanismos controladores que definem o resultado final.

Os padrões de expressão dos genes ora observados indicam que o crescimento gengival induzido por medicamentos apresenta fases diferentes e parecem justificar os dados contraditórios encontrados na literatura. Dessa forma é possível obter como resultado um aumento ou diminuição da expressão dos genes da MMP-1, MMP-2 ou do colágeno do tipo I, de acordo com a fase de desenvolvimento da lesão. Essas modificações físicas da expressão genética seriam resultantes da expressão transitória de fatores de crescimento, em uma cascata de eventos cronologicamente característica para cada medicamento (UZEL et al., 2001). Similarmente, os aspectos histológicos modificam em função do estágio do desenvolvimento da lesão, havendo inclusive, relatos de proliferação transitória de fibroblastos (HASSEL et al., 1982; SPOLIDORIO et al., 2004). Em longo prazo, há uma tendência de retorno aos valores normais, mesmo com a manutenção dos medicamentos (SPOLIDORIO et al., 2004). Neste experimento uma tendência à normalidade não pôde ser comprovada, entretanto, através das análises histológica e do RT-PCR. Talvez um período maior de experimentação fosse necessário para avaliar se essa mesma tendência se manifesta no macaco-prego.

5 CONCLUSÃO

Com base na metodologia empregada na execução do presente trabalho, julga-se que os resultados obtidos em macacos permitem concluir que a ciclosporina, a nifedipina e a fenitoína:

- ocasionam o aumento de fibras colágenas imaturas, a despeito da ausência de evidências clínicas de crescimento excessivo de gengiva;
- induzem a modificações da expressão dos genes da MMP-1, MMP-2 e colágeno do tipo I em padrões diferentes para cada medicamento;
- ocasionam modificações do metabolismo do colágeno caracterizadas por fases diferentes e de forma não uniforme em toda a extensão da gengiva;
- modificam o metabolismo do colágeno independentemente da idade, embora de forma menos severa em adultos.

REFERÊNCIAS

ADDY, V.; McELNAY, J. C.; EYRE, D. G.; CAMPBELL, N.; D'ARCY, P.F. Risk factors in phenytoin-induced gingival hyperplasia. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 54, n. 6, p. 373-377, Jun. 1983.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4.ed. New York: Garland Publishing, 2002. 1294 p.

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

BIRKEDAL-HANSEN, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, Philadelphia, v. 7, n. 5, p 728-735, Oct. 1995.

BOLZANI, G.; COLETTA, R. D.; MARTELLI JÚNIOR, H.; ALMEIDA, O. P.; GRANER, E. Cyclosporin A inhibits production and activity of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 35, n. 1, p. 51-58, Feb. 2000.

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

BRUNET, L.; MIRANDA, J.; ROSET, P.; BERINI, L.; FARRE, M.; MENDIETA, C. Prevalence and risk of gingival enlargement in patients treated with anticonvulsant drugs. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 31, n. 9, p. 781-788, Sep. 2001.

CALNE, R.Y.; ROLLES, K.; WHITE, D.J.; THIRU, S.; EVANS, D.B.; HENDERSON, R.; HAMILTON, D.L.; BOONE, N.; MCMASTER, P.; GIBBY, O.; WILLIAMS, R. Cyclosporin-A in clinical organ grafting. **Transplant. Proc.**, New York, v. 13, n. 1, pt. 1, p. 349-358, Mar. 1981.

CHAVRIER, C.; COUBLE, M.L.; MAGLOIRE, H.; GRIMAUD, J. A. Connective tissue organization of healthy human gingiva. Ultrastructural localization of collagen types I-III-IV. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 19, n. 3, p. 221-229, May 1984.

CHO, M. I.; GARANT, P. R.; LEE, Y. L. Immunohistological localization of collagen (I and III) and fibronectin in inflamed and non-inflamed gingival connective tissue and sulcular fluid of beagle dogs. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 19, n. 6, p. 638-641, Nov. 1984.

CHO, M. I.; LEE, Y. L.; GARANT, P. R. Localization of fibronectin in gingival connective tissue of the beagle dog. Immunofluorescent light microscopic findings. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 56, n. 11, p. 677-685, Nov. 1985.

CHO, M. I.; LEE, Y. L.; GARANT, P. R. Localization of fibronectin in gingival connective tissue of the beagle dog. Ultrastructural detection with ferritin and peroxidase-conjugated antibodies. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 57, n. 7, p. 413-421, Jul. 1986.

COTRIM, P.; ANDRADE, C. R.; MARTINELLI-JUNIOR, H.; GRANER, E.; SAUK, J. J.; COLETTA, R. D. Expression of matrix metalloproteinases in cyclosporin-treated gingival fibroblasts is regulated by transforming growth factor (TGF)- β 1 autocrine stimulation. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 73, n. 11, p. 1313-1322, Nov. 2002.

DAHLLÖF, G.; MODÈER, T.; REINHOLT, F. P.; WIKSTRÖM, B.; HJERPE, A. Proteoglycans and glycosaminoglycans in phenytoin-induced gingival overgrowth. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 21, n. 1, p. 13-21, Jan. 1986.

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

DAYAN, D.; HISS, Y.; HIRSHBERG, A.; BUBIS, J. J.; WOLMAN, M. Are the polarization colors of Picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? **Histochemistry.**, Berlin, v. 93, n. 1, p. 27-29, 1989.

DAYAN, D.; WANER, T.; TAL, H.; NYSKA, A. Polarization microscopy of picrosirius red-stained collagen from oxodipine-induced hyperplastic gingival of beagle dogs. **Int. J Exp. Path.**, Oxford, v. 74, n. 3, p. 225-228, 1993.

ELLIS, J. S. , SEYMOUR, R. A., STEELE, J. G., ROBERTSON, P., BUTLER, T. J., THOMASON, J. M. Prevalence of gingival overgrowth induced by calcium channel blockers: community-based study. **J Periodontol.**, Chicago, v. 70, n. 1, p. 63-67, Jan. 1999.

FREESE, C. H.; OPPENHEIMER, J. R. The capuchin monkeys, genus *Cebus*. In: COIMBRA-FILHO, A. F.; MITTERMEIER, R. A. (Ed). **Ecology and behavior of neotropical primates**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1981. p. 331-390.

FU, E.; NIEH, S.; CHANG, H. L.; WANG, S. L. Dose-dependent gingival overgrowth induced by cyclosporin in rats. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 66, n. 7, p. 594-598, Jul. 1995.

FUJII, A.; MATSUMOTO, H.; NAKAO, S.; TESHIGAWARA, H.; AKIMOTO, Y. Effect of calcium-channel blockers on cell proliferation, DNA synthesis and collagen synthesis of cultured gingival fibroblasts derived from human nifedipine responders and non-responders. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 99-104, Feb. 1994.

GAGLIANO, N., MOSCHENI, C., DELLAVIA, C., TORRI, C., STABELLIN, I. G., FERRARIO, V. F., GIOIA, M. . Effect of cyclosporinA on human gingival fibroblast collagen turnover in relation to the development of gingival overgrowth: an in vitro study. **Biomed. Pharmacother.**, New York, v. 58, n. 4, p. 231-238, May 2004.

HALL, B. K.; SQUIER, C.A. Ultrastructural quantitation of connective tissue changes in phenytoin-induced gingival overgrowth in the ferret. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 61, n. 7, p. 942-952, Jul. 1982.

HALLMON, W.; ROSSMANN, J. A. The role of drugs in the pathogenesis of gingival overgrowth. A collective review of current concepts. **Periodontol 2000**, Copenhagen, v. 21, p. 176-196, Oct. 1999.

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

HASSELL, T. M.; PAGE, R. C.; LINDHE, J. Histologic evidence for impaired growth control in diphenylhydantoin gingival overgrowth in man. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 381-384, 1978.

HASSELL, T. M.; BURTNER, A. P.; McNEAL, D.; SMITH, R. G. Oral problems and genetic aspects of individuals with epilepsy. **Periodontol.** 2000., Copenhagen, v. 6, p. 68-78, Oct. 1994.

HASSELL, T. M.; ROEBUCK, S.; PAGE, R. C.; WRAY, S. H. Quantitative histopathologic assessment of developing phenytoin-induced gingival overgrowth in cat. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 9, n. 5, p. 365-372, Sep. 1982.

HYLAND, P. L.; TRAYNOR, P. S.; MYRILLAS, T. T.; MARLEY, J. J.; LINDEN, G. J.; WINTER, P.; LEADBETTER, N.; CAWSTON, T. E.; IRWIN, C. R. The effects of cyclosporine on the collagenolytic activity of gingival fibroblasts. **J. Periodontol.** Chicago, v. 74, n. 4, p. 437-445, Apr. 2003.

IACOPINO, A. M.; DOXEY, D.; CUTLER, C. W.; NARES, S.; STOEVEER, K.; FOJT, J.; GONZALES, A.; DILL, R.E. Phenytoin and cyclosporine A specifically regulate macrophage phenotype and expression of platelet-derived growth factor and Interleukin-1 in vitro and in vivo: possible molecular mechanism of drug-induced gingival hyperplasia. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 68, n. 1, p. 73-83, Jan. 1997.

ISHIDA, H.; KONDOH, T.; KATAOKA, M.; NISHIKAWA, S.; NAKAGAWA, T.; MORISAKI, I.; KIDO, J.; OKA, T.; NAGATA, T. Factors influencing nifedipine-induced gingival overgrowth in rats. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 66, n. 5, p. 345-350, May 1995.

JAMES, J. A.; IRWIN, C. R.; LINDEN, G. J. Gingival fibroblast response to cyclosporin A and transforming growth factor β 1. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 33, n. 1, p. 40-48, Jan. 1998.

KATAOKA, M.; SHIMIZU, Y.; KUNIKIYO, K.; ASAHARA, Y.; AZUMA, H.; SAWA, T.; KIDO, J.; NAGATA, T. Nifedipine induces gingival overgrowth in rats through a reduction in collagen phagocytosis by gingival fibroblasts. **J. Periodontol.**, Chicago, v.72, n. 8, p. 1078-1083, Aug. 2001.

KATO, T.; OKAHASHI, N.; KAWAI, S.; KATO, T.; INAGA, H.; MORISAKI, I.; AMANO, A. Impaired degradation of matrix collagen in human gingival fibroblasts by the antiepileptic drug phenytoin. **J. Periodontol.**, Chicago, v.76, n. 6, p. 941-950, Jun. 2005.

KUBOTA, T.; NOMURA, T.; TAKAHASHI, T.; HARA, K. Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontitis-affected human gingival tissue. **Archs. Oral Biol.**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 253-262, Mar. 1996.

LODISH, H. , BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular cell biology**. 4.ed. New York: WH Freeman, 2000. p. 979-993.

MARIANI, G.; CALASTRINI, C.; CARINCI, F.; MARZOLA, R.; CALURA, G. Ultrastructural features of cyclosporine A-induced gingival hyperplasia. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 64, n. 11, p. 1092-1097, Nov. 1993.

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.**, Chicago, v. 67, n. 1, p. 21-27, Jan. 1996.

MARIOTTI, A.; HASSELL, T.; JACOBS, D.; MANNING, C. J.; HEFTI, A. F. Cyclosporin A and hydroxycyclosporine (M-17) affect the secretory phenotype of human gingival fibroblasts. **J. Oral Pathol. Med.**; Copenhagen, v. 27, n. 6, p.260-266, Jul. 1998.

MARSHALL, R. I.; BARTOLD, P. M. A clinical review of drug-induced gingival overgrowths. **Aust. Dent. J.**, Sydney, v. 44, n. 4, p. 219-232, Dec. 1999.

MARTINS, R. C. L.; WERNECK, C. C.; ROCHA, L. A.; FERES FILHO, E. J.; SILVA, L. C. Molecular size distribution analysis of human gingival glycosaminoglycans in cyclosporin- and nifedipine induced overgrowths. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v. 38, n. 2, p. 182-189, Apr. 2003.

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.**, St. Louis, v. 64, n. 3, p. 293-297, Sep. 1987.

McGAW, W. T.; PORTER, H. Cyclosporine-induced gingival overgrowth: an ultrastructural stereologic study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 65, n. 2, p. 186-190, Feb. 1988.

McKEVITT, K. M. B.; IRWIN, C. R. Phenotypic differences in growth, matrix synthesis and response to nifedipine between fibroblasts derived from clinically healthy and overgrown gingival tissue. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 24, n. 2, p. 66-71, Feb. 1995.

MEIKLE, M.C.; HEMBRY, R.M.; HOLLEY, J.; HORTON, C.; MCFARLANE, C.G.; REYNOLDS, J.J. Immunolocalization of matrix metalloproteinases and TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases) in human gingival tissues from periodontitis patients. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 29, n. 2, p. 118-126, Mar. 1994.

MELLER, A. T.; RUMJANEK, V. M.; SANSONE, C.; ALLODI, S. Oral mucosa alterations induced by cyclosporin in mice: morphological features. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 37, n. 6, p. 412-415, Dec. 2002.

MILLER, C. C.; SEPTIER, D.; BONNEFOIX, M.; LECOLLE, S.; LEBRETON-DECOSTER, C.; COULOMB, B.; PELLAT, B.; GODEAU, G. Human dermal and gingival fibroblasts in a three-dimensional culture: a comparative study on matrix remodeling. **Clin Oral Invest**, Berlin, v. 6, n. 1, p. 39-50, Mar. 2002.

MIRANDA, J.; BRUNET, T. L.; ROSET, P.; BERINI, L.; FARRE, M.; MENDIETA, C. Prevalence and risk of gingival enlargement in patients treated with nifedipine. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 72, n. 5, p. 605-611, May 2001.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. The use of the picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 1-11, 1991.

MORISAKI, I.; KATO, K.; LOYOLA-RODRIGUEZ, J.P.; NAGATA, T.; ISHIDA, H. Nifedipine-induced gingival overgrowth in the presence or absence of gingival inflammation in rats. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 28, n. 6, pt. 1, p. 396-403, Nov. 1993.

MORISAKI, I. MIHARA, J.; KATO, K.; KITAMURA, K.; ADACHI, C.; SOBUE, S.; HAMADA, S. Phenytoin-induced gingival overgrowth in rats infected with *Streptococcus sobrinus* 6715. **Archs. Oral Biol.**, Oxford, v. 35, n. 9, p. 753-758, 1990.

NAGASE, H.; WOESSNER JUNIOR, J. F. Matrix metalloproteinases. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 274, n. 31, p. 21491-21494, Jul. 1999.

NARAYANAN, A. S.; CLAGETT.; J. A.; PAGE, R. C. Effect of inflammation on the distribution of collagen types I, III, IV and V and type I trimer and fibronectin in human gingivae. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 64, n. 9, p. 1111-1116, Sep. 1985.

NARES, S.; NG, M. C.; DILL, R. E.; PARK, B.; CUTLER, C. W.; IACOPINO, A. M. Cyclosporine A upregulates platelet-derived growth factor B chain in hyperplastic human gingiva. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 67, n. 3, p. 271-278, Mar. 1996

NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D.; ALLEN, C. M.; BOUQUOT, J. E. **Patologia oral & maxilofacial**. 2.ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004. p. 126-128.

NISHIKAWA, S.; NAGATA, T.; MORISAKI, I.; OKA, T.; ISHIDA, H. Pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. A review of studies in the rat model. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 67, n. 5, p. 463-471, May 1996.

NISHIKAWA, S.; TADA, H.; HAMASAKI, A.; KASAHARA, S.; KIDO, J.; NAGATA, T.; ISHIDA, H.; WAKANO, Y. Nifedipine-induced gingival hyperplasia: a clinical and in vitro study. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 62, n. 1, p. 30-35, Jan. 1991.

NURMENNIEMI, P. K.; PERNU, H. E.; LAUKKANEN, P.; KNUUTTILA, M. L. E. Macrophage subpopulations in gingival overgrowth induced by nifedipine and immunosuppressive medication. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 73, n. 11, p. 1323-1330, Nov. 2002.

PERNU, H. E.; KNUUTTILA, M. L. E. Macrophages and lymphocyte subpopulations in nifedipine- and cyclosporine A- associated human gingival overgrowth. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 72, n. 2, p. 160-166, Feb. 2001.

PILATTI, G. L.; SAMPAIO, J. E. C. The influence of chlorhexidine on the severity of cyclosporin A-induced gingival overgrowth. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 68, n. 9, p. 900-904, Sep. 1997.

PISANTY, S.; SHOSHAN, S.; CHAJEK, T.; MAFTSIR, G.; SACKS, B.; BENEZRA, D. The effect of cyclosporin A (CsA) treatment on gingival tissue of patients with Behçet's disease. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 59, n. 9, p. 599-603, Sep. 1988.

PLEMONS, J. M.; DILL, R. E.; REES, T. D.; DYER, B. J.; NG, M. C.; IACOPINO, A. M. PDGF-B producing cells and PDGF-B gene expression in normal gingival and cyclosporine A-induced gingival overgrowth. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 67, n. 3, p. 264-270, Mar. 1996.

REDLICH, M.; GREENFELD, Z.; COOPERMAN, H.; PISANTY, S.; SHOSHAN, S. Lack of influence of cyclosporine A on levels of gingival procollagen types I and III mRNAs in rats of different ages. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 42, n. 4, p. 277-282, Apr. 1997.

REUNANEN, N; KÄHÄRI, V.M. Cell invasion. In: Eureka Bioscience Collection.

Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=eureka.chapter.12175>>. Acesso em: 28 nov. 2005.

RICH, L.; WHITTAKER, P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrilla hue and spatial distribution. **Braz. J. Morphol. Sci.**; Campinas, v. 22, n. 2, p. 97-104, Apr./Jun. 2005

ROMANELLI, R.; ROMANELLI, R.; MANCINI, S.; LASCHINGER, C.; OVERALL, C.M.; SODEK, J.; MCCULLOCH, C.A. Activation of neutrophil collagenase in periodontitis. *Infect. Immun.*, Washington, v. 67, n. 5, p. 2319-2326, May 1999.

ROMANOS, G. E.; STRUB, J. R.; BERNIMOULIN, J-P. Immunohistochemical distribution of extracellular matrix proteins as a diagnostic parameter in healthy and diseased gingival. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 64, n. 2, p. 110-119, Feb. 1993a.

ROMANOS, G. E.; SCHRÖTER-KERMANI, C.; HINZ, N.; BERNIMOULIN, J-P. Distribution of fibronectin in healthy, inflamed and drug-induced gingival hyperplasia. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 21, n. 6, p. 256-260, Jul. 1992.

ROMANOS, G. E.; SCHRÖTER-KERMANI, C.; HINZ, N.; HERRMANN, D.; STRUB, J. R.; BERNIMOULIN, J-P. Extracellular matrix analysis of nifedipine-induced gingival overgrowth: immunohistochemical distribution of different collagen types as

well as the glycoprotein fibronectin. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 28, n. 1, p. 10-16, Jan. 1993b.

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

SCHINCAGLIA, G. P.; 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.**, Copenhagen, v. 21, n. 4, p. 181-185, Apr. 1992.

SCULEAN, A.; JUNKER, R.; DONOS, N.; BERAKDAR, M.; BRECX, M.; DÜNKER, N. Immunohistochemical evaluation of matrix molecules associated with wound healing following regenerative periodontal treatment in monkeys. **Clin Oral Invest**, Berlin, v. 6, n. 3, p. 175–182, Sep. 2002.

SEYMOUR, R. A.; THOMASON, J. M.; ELLIS, J. S. The pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 23, n. 3, pt. 1, p. 165-175, Mar. 1996.

SPOLIDORIO, L.C.; SPOLIDORIO, D. M.; HOLZHAUSEN, M. Effects of long-term cyclosporin therapy on the periodontium of rats. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 39, n. 4, p. 257-262, Aug. 2004.

SPOLIDORIO, L.C.; SPOLIDORIO, D.M.; HOLZHAUSEN, M.; NASSAR, P.O.; NASSAR, C.A. Effects of long-term cyclosporin therapy on gingiva of rats--analysis by stereological and biochemical estimation. **Braz. Oral Res.**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 112-118, Apr./Jun. 2005.

SPOLIDORIO, L. C.; SPOLIDORIO, D. M.; NEVES, K. A.; GONZAGA, H. F. S.; ALMEIDA, O. P. Morphological evaluation of combined effects of cyclosporine and nifedipine on gingival overgrowth in rats. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 37, n. 3, p. 192-195, Jun. 2002.

SPOLIDORIO, L.C.; MERZEL, J.; VILLALBA, H.; VARGAS, P.A.; COLETTA, R.D.; ALMEIDA, O.P. Morphometric evaluation of gingival overgrowth and regression caused by cyclosporin in rats. **J Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 36, n. 6, p. 384-389, Dec. 2001.

STAPLE, P. H.; REED, M. J.; MASHIMO, P. A. Diphenylhydantoin gingival hyperplasia in *Macaca arctoides*: a new human model. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 48, n. 6, p. 325-336, Jun. 1977.

STAPLE, P. H.; REED, M. J.; MASHIMO, P. A.; SEDRANSK, N.; UMEMOTO, T. Diphenylhydantoin gingival hyperplasia in *Macaca arctoides*: prevention by inhibition of dental plaque deposition. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 49, n. 6, p. 310-325, Jun. 1978.

THOMASON, J. M.; SEYMOUR, R. A.; RICE, N. The prevalence and severity of cyclosporin and nifedipine-induced gingival overgrowth. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 20, n. 1, p. 37-40, Jan. 1993.

THOMASON, J. M.; SLOAN, P.; SEYMOUR, R. A. Immunolocalization of collagenase (MMP-1) and stromelysin, (MMP-3) in the gingival tissues of organ transplant patients medicated with cyclosporin. **J. Clin. Periodontol.**, Chicago, v. 25, n. 7, p. 554-560, Jul. 1998.

TIPTON, D. A.; DABBOUS, M. K. Heterogeneity of gingival fibroblast response to cyclosporine. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 65, n. esp., p. 331, 1986. (abstract n. 1457).

UZEL, M. I.; KANTARCI, A.; HONG, H-H.; UYGUR, C.; SHEFF, M. C.; FIRATLI, E.; TRACKMAN, P. C. Connective tissue growth factor in drug-induced gingival overgrowth. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 72, n. 7, p. 921-931, Jul. 2001.

WERFULLY, S.; AREIBI, G.; TONER, M.; BERGQUIST, J.; WALKER, J.; RENVERT, S.; CLAFFEY, N. Tensile strength, histological and immunohistochemical observations of periodontal wound healing in the dog. **J Periodontal Res**, Copenhagen, v. 37, n. 5, p. 366–374, Oct. 2002.

WOOLLEY, D. E.; DAVIES, R.M. Immunolocalization of collagenase in periodontal disease. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 16, n. 3, p. 292-297, May. 1981.

WYSOCKI, G. P.; GRETZINGER, H. A.; LAUPACIS, A.; ULAN, R. A.; STILLER, C. R. Fibrous hyperplasia of the gingival: a side effect of cyclosporin A therapy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 55, n. 3, p. 274-278, Mar. 1983.

YAMADA, H.; NISHIMURA, F.; NARUISHI, K.; CHOU, H. H.; TAKASHIBA, S.; ALBRIGHT, G. M.; NARES, S.; IACOPINO, A. M.; MURAYAMA, Y. Phenytoin and cyclosporine A suppress the expression of MMP-1, TIMP-1, and cathepsin L, but not cathepsin B in cultured gingival fibroblasts. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 71, n. 6, p. 955-960, Jun. 2000.

ZEBROWSKI, E. J.; RAMAMURTHY, N. S.; SINGER, D. L.; BRUNKA, J. R. Collagenase activity of cyclosporin, nifedipine and phenytoin treated fibroblasts. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 67, n. esp., p.331, 1988. (abstract n. 1751).

ZEBROWSKI, W. J.; PYLYPAS, S. P.; ODLUM, O.; JOHNSON, R. B. Comparative metabolism by fibroblast populations exposed to cyclosporine. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 65, n. 6, p. 565-567, Jun. 1994.

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CAMPUS DE ARAÇATUBA – FACULDADE DE ODONTOLOGIA
CURSOS DE ODONTOLOGIA E DE MEDICINA VETERINÁRIA

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Estudo comparativo do efeito da fenitoína, nifedipina e ciclosporina em gengiva de macacos-prego” sob responsabilidade de **ALVIMAR LIMA DE CASTRO, CLÁUDIA MISUE KANNO, MARCELO MACEDO CRIVELINI e JOSÉ AMÉRICO DE OLIVEIRA** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em reunião de 07/07/2003, de acordo com o protocolo nº 41/03.

Araçatuba, 21 de agosto de 2003.

Adelina M.S.

Profª. Ass. Dra. Adelina Maria da Silva

Presidente

ANEXO II

ÍNDICE DE MÜHLEMANN AND MAZOR (1958)

CRITÉRIO PARA ÍNDICE DE SANGRAMENTO DE SULCO

- 0 Sem inflamação; sem sangramento à sondagem
- 1 Sangramento do sulco gengival à sondagem delicada; de outra forma o sulco parece normal
- 2 Sangramento à sondagem mais alterações na cor devido à inflamação
- 3 Sangramento à sondagem mais alterações na cor e edema discreto
- 4 Sangramento à sondagem, alterações na cor e edema óbvio
- 5 Sangramento à sondagem e sangramento espontâneo, alteração de cor, edema marcante com ou sem ulceração

ÍNDICE DE LÖE & SILNESS (1963)

CRITÉRIO PARA ÍNDICE GENGIVAL (GI)

- 0 Gengiva normal
- 1 Inflamação tênue, leve alteração de cor, edema leve, sem sangramento à sondagem
- 2 Inflamação moderada, vermelhidão, edema e brilho, sangramento à sondagem
- 3 Inflamação severa, edema e vermelhidão marcantes, ulcerações, tendência ao sangramento espontâneo

ANEXO III
PROTOCOLO DE IMUNOISTOQUÍMICA

1. Xilol I – 30 minutos a 60° C
2. Xilol II – 20 minutos em temperatura ambiente
3. Etanol absoluto I – 5 minutos
4. Etanol absoluto II – 5 minutos
5. Etanol absoluto III – 5 minutos
6. Etanol 95% - 5 minutos
7. Etanol 85% - 5 minutos
8. Hidróxido de amônia – 10 minutos
9. Lavagem em água corrente – 10 minutos
10. Lavagem em água destilada, com uma troca
11. Tratamento para recuperação de antígenos
12. Lavagem em água corrente, com uma troca
13. Lavagem em água destilada, com uma troca
14. Bloqueio da peroxidase endógena (água oxigenada 20 volumes + metanol 1:1) com uma troca após 5 minutos
15. Lavagem em água corrente - 10 minutos
16. Lavagem em água destilada
17. Lavagem em solução Tris durante 10 minutos, com uma troca após 5 minutos
18. Incubação em anticorpo primário
19. Lavagem em solução Tris durante 10 minutos, com uma troca após 5

minutos

20. Incubação em soro de ligação durante 30 minutos
21. Lavagem em solução Tris durante 10 minutos, com uma troca após 5 minutos
22. Incubação em solução com complexo streptoavidina/biotina, durante 30 minutos.
23. Lavagem em solução Tris durante 10 minutos, com uma troca após 5 minutos
24. Revelação em solução de DAB
25. Lavagem em solução Tris
26. Lavagem em água corrente - 5 minutos
27. Lavagem em água destilada
28. Contracoloração com hematoxilina de Meyer durante 15 minutos
29. Lavagem em água corrente
30. Lavagem em água destilada
31. Desidratação, diafanização e montagem

ANEXO IV
PROTOCOLO DE COLORAÇÃO COM SOLUÇÃO DE VERMELHO
PICROSIRIUS

1. Diafanização e hidratação
2. Coloração em solução de vermelho picrosirius – 01 hora
3. Lavagem em água acidificada, durante 01 minuto, com uma troca
4. Remoção do excesso de solução das lâminas
5. Desidratação em álcool absoluto, com duas trocas
6. Diafanização e montagem

Solução de vermelho picrosirius (500 ml)

Vermelho sirius F3B.....0,5 g

Água destilada.....500 ml

Ácido pícrico.....15 g

Água acidificada

Ácido acético glacial.....5 ml

Água destilada.....1 l

ANEXO V**PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE mRNA**

1. Maceração do tecido em nitrogênio líquido
2. Agitação em 1 ml de Trizol para cada 100 mg de amostra, em Vortex
3. Manutenção em meio ambiente durante 5 minutos
4. Adição de 200 µl de clorofórmio gelado
5. Agitação manual durante 15 segundos
6. Manutenção em meio ambiente durante 02 minutos
7. Centrifugação a 4° C, a 14000 rpm, durante 10 minutos
8. Coleta da fase líquida sobrenadante
9. Adição de 500 µl isopropanol gelado
10. Manutenção em gelo durante 10 minutos
11. Centrifugação a 4° C, a 14000 rpm, durante 10 minutos
12. Descarte do sobrenadante
13. Lavagem do pellet em etanol gelado a 70 %, com agitação em Vortex
14. Centrifugação a 4° C, a 7500 rpm, durante 5 minutos
15. Secagem do pellet em meio ambiente, durante 10 minutos
16. Diluição do pellet em 20 µl de TE pH 8,0
17. Manutenção em banho-maria a 56°C, durante 10 minutos
18. Tratamento com DNase (1 µl DNase, 2,5 µl tampão, 1,5 µl água DEPC)
19. Manutenção em banho-maria a 37°C, durante 10 minutos

ANEXO VI
SÍNTESE DE cDNA

Reagentes	Ciclo
750 ng de RNA, 1µl Oligo dT. Completar para 10 µl com H ₂ O Depc	70°C por 10 minutos
Adicionar 2 µl Buffer PCR 10x 2 µl MgCl ₂ 25 mM 1 µl dNTP 10 mM 2 µl DTT 0,2 M	42°C por 5 minutos
Adicionar 1 µl Super Script II RT	42°C por 50 minutos 70°C por 15 minutos
Adicionar 1 µl de RNAase H	32°C por 20 minutos

ANEXO VII

VALIDAÇÃO DOS CICLOS DO RT-PCR

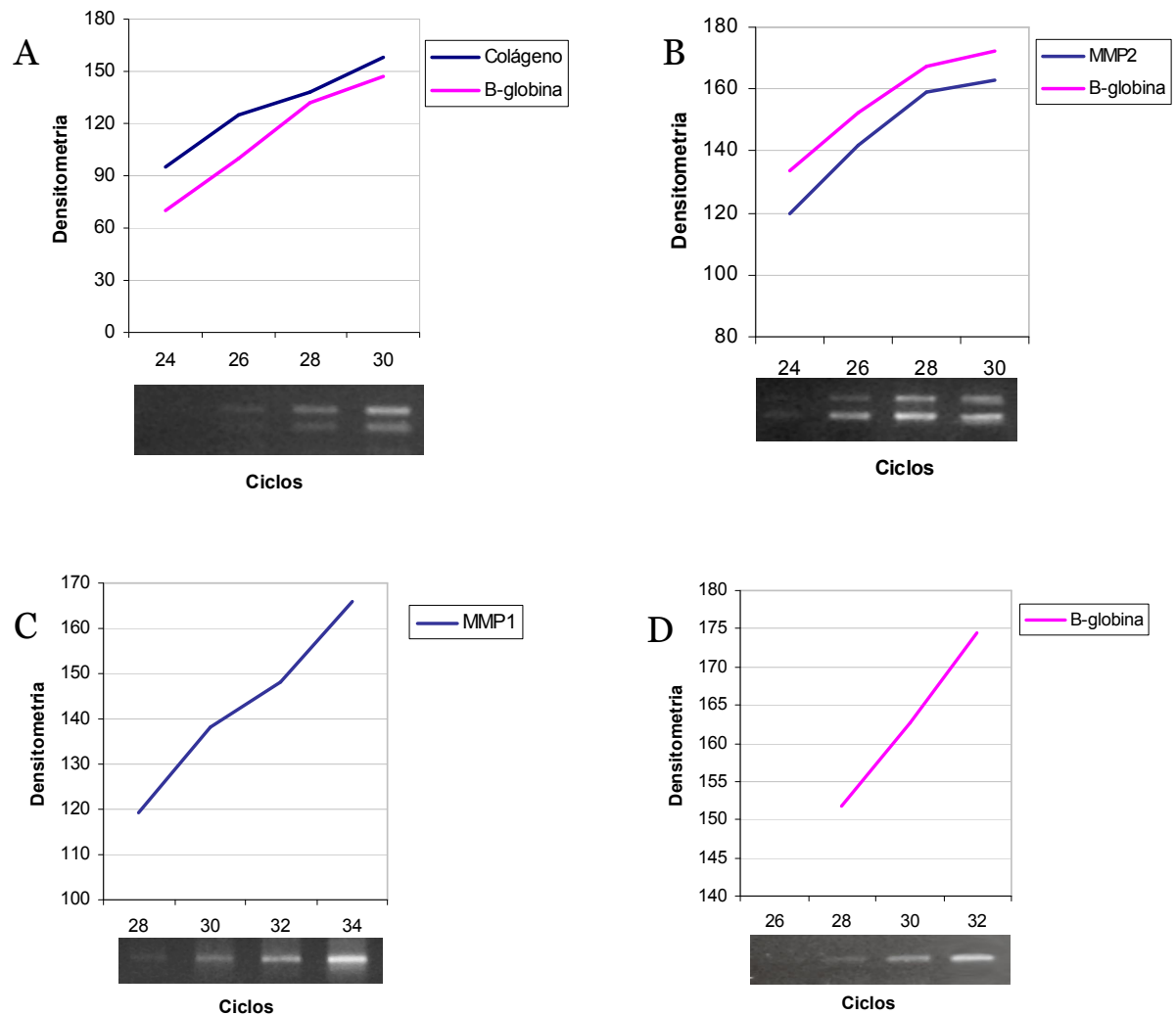


Figura 6. Validação do número de ciclos. Colágeno – 29 (A), MMP-2 – 27 (B), MMP-1 – 32 (C), e Beta-globina – 29 (D).

ANEXO VIII SEQÜENCIAMENTO DOS PRODUTOS DO RT-PCR

COLÁGENO DO TIPO I (Col1 α 1)

Homologia entre mRNA (Col1 α 1) humano e de macaco *Cebus apella* – 91%

```
Cebus apella CCTGGTTAAAACGGAGCTCCTGGTCAGTATGGGCCCCCGTGGTCTGCCTGGTGTAGAGTA 60
          ||||| |||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Homo sapiens CTGGTGAAAATGGAGCTCCTGGTCAG-ATGGGCCCCCGTGGCCTGCCTGGTG-AGAG-A 1049

Cebus apella GGTCGCCCTGGTACCCCTGGCCCTGCTGGTGCTCGTGGGTAAAATGATGGTGCTACTGG 120
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Homo sapiens GGTCGCCCTGG-AGCCCCTGGCCCTGCTGGTGCTCGTGG---AAATGATGGTGCTACTGG 1105

Cebus apella TGCTGCC 127
          |||||
Homo sapiens TGCTGCC 1112
```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```
Homo sapiens CCTGGTGAAAATGGAGCTCCTGGTCAG-ATGGGCCCCCGTGGCCTGCCTGGTG-AGAG-A 57
Cebus apella CCTGGTTAAAACGGAGCTCCTGGTCAGTATGGGCCCCCGTGGTCTGCCTGGTGTAGAGTA 60
*****  ****  *****

Homo sapiens GGTCGCCCTGG-AGCCCCTGGCCCTGCTGGTGCTCGTGG---AAATGATGGTGCTACTGG 113
Cebus apella GGTCGCCCTGGTACCCCTGGCCCTGCTGGTGCTCGTGGGTAAAATGATGGTGCTACTGG 120
*****  *  *****

Homo sapiens TGCTGCC 120
Cebus apella TGCTGCC 127
*****
```

MMP-1**Homologia entre DNA (MMP-1) humano e de macaco Cebus apella – 99%**

Cebus apella	TCCTCACTGAGGGGTACCCCTCGCTGGGAGCACCCACATCTGACCTACAGGTAGGCAGACT	60
Homo sapiens	TCCTCACTGAGGGGAACCCCTCGCTGGGAGCAAACACATCTGACCTACAGGTAGGCAGACT	2861
Cebus apella	AGGGCCAGAGTGAGAGAGCTATTTCCCATGACAGTGGTAAGAAGTCATGTCCAATGTGT	120
Homo sapiens	GAGGGCCAGAGTGAGAGAGCTATTTCCCATGACAGTGGTAAGAAGTCATGTCCAATGTGT	2921
Cebus apella	CTCTATTTTGTTCATTCTAAGGATTGAAAATTACACGCCAGATTTGCCAAGAGCAGATG	180
Homo sapiens	CTCTATTTTGTTCATTCTAAGGATTGAAAATTACACGCCAGATTTGCCAAGAGCAGATG	2981
Cebus apella	TGGACCATGCCATTGAGAAAGCCTTCCAACCTCTGGAGTAATGTCACACCTCTGACATTCA	240
Homo sapiens	TGGACCATGCCATTGAGAAAGCCTTCCAACCTCTGGAGTAATGTCACACCTCTGACATTCA	3041
Cebus apella	CCAAGGTCTCTGAGGGTCAAGCAGACATCATGATATCTTTTGTGAGGGGAGGTAAGTTCT	300
Homo sapiens	CCAAGGTCTCTGAGGGTCAAGCAGACATCATGATATCTTTTGTGAGGGGAGGTAAGTTCT	3101
Cebus apella	TCTTATAGCACCTTAACCTCACCTTGCCCCTAGATCTCGTAGCTTTGCAACTGGAATTGA	360
Homo sapiens	TCTTATAGCACCTTAACCTCACCTTGCCCCTAGATCTCGTAGCTTTGCAACTGGAATTGA	3161
Cebus apella	TTGTTTAAGATGAATGTTGATTTTATGGGCTCGAAGAGGGAAACTGCATCACAGTTGATG	420
Homo sapiens	TTGTTTAAGATGAATGTTGATTTTATGGGCTCGAAGAGGGAAACTGCATCACAGTTGATG	3221
Cebus apella	GAAGTCTGTTGGCCTCTTAACAAAGCTAATGCTTGCCCTTCTGGCTTAGCTTACATAAGA	480
Homo sapiens	GAAGTCTGTTGGCCTCTTAACAAAGCTAATGCTTGCCCTTCTGGCTTAGCTTACATAAGA	3281

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

Homo sapiens	TCCTCACTGAGGGGAACCC	2820
Cebus apella	TCCTCACTGAGGGGTACCC	19
	*****	****
Homo sapiens	TCGCTGGGAGCAAACACATCTGACCTACAGGTAGGCAGACTGAGGGCCAGAGTGAGAGAG	2880
Cebus apella	TCGCTGGGAGCACCCACATCTGACCTACAGGTAGGCAGACTGAGGGCCAGAGTGAGAGAG	79
	*****	*****
Homo sapiens	CTATTTCCCATGACAGTGGTAAGAAGTCATGTCCAATGTGTCTCTATTT-TGTTTCATTC	2939
Cebus apella	CTATTTCCCATGACAGTGGTAAGAAGTCATGTCCAATGTGTCTCTATTT-TGTTTCATTC	138
	*****	*****
Homo sapiens	TAAGGAT-TGAAAATTACACGCCAGATTTGCCAAGAGCAGATGTGGACCATGCCATTGAG	2998
Cebus apella	TAAGGAT-TGAAAATTACACGCCAGATTTGCCAAGAGCAGATGTGGACCATGCCATTGAG	197
	*****	*****
Homo sapiens	AAAGCCTTCCAACCTCTGGAGTAAT-GTCACACCTCTGACATTCACCAAGGTCTCTGAGGG	3057
Cebus apella	AAAGCCTTCCAACCTCTGGAGTAAT-GTCACACCTCTGACATTCACCAAGGTCTCTGAGGG	256
	*****	*****

```

Homo sapiens TCAAGCAGACATCATGATATCTTTTGTGAGGGGAGGTAAGTTCTTCTTATA-GCACCTTA 3116
Cebus apella TCAAGCAGACATCATGATATCTTTTGTGAGGGGAGGTAAGTTCTTCTTATA-GCACCTTA 315
*****

Homo sapiens ACCTCACCT-TGCCCCTAGATCT-CGTAGCT-TTGCAACT-GGAATTGATTGTTTAAGAT 3172
Cebus apella ACCTCACCT-TGCCCCTAGATCT-CGTAGCT-TTGCAACT-GGAATTGATTGTTTAAGAT 371
*****

Homo sapiens GAATGTTGATTTTATGGGCTCGAAGAGGGAACTGCATCACAGTTGATGGAAGTCTGTTG 3232
Cebus apella GAATGTTGATTTTATGGGCTCGAAGAGGGAACTGCATCACAGTTGATGGAAGTCTGTTG 431
*****

Homo sapiens GCCTCTTAACAAAGCTAATGCTTGCCCTTCTGGCTTAGCTTACATAAGAACCACAAGGAA 3292
Cebus apella GCCTCTTAACAAAGCTAATGCTTGCCCTTCTGGCTTAGCTTACATAAGAC----- 481
*****

```

Homologia entre mRNA (MMP-1) humano e de macaco Cebus apella – 96%

```

Cebus apella GTGATGAAGCAGCCCAGATGTGGAGTGCCTGATGTGGCTCGGTTTGTCTCACTGAGGGG 60
|||||
Homo sapiens GTGATGAAGCAGCCCAGATGTGGAGTGCCTGATGTGGCTCAGTTTGTCTCACTGAGGGG 315

Cebus apella AACCCCTCGTTGGGAGAAAACACATCTGACCTACAGGATTGAAAATTACACTCCAGATTTG 120
|||||
Homo sapiens AACCCCTCGCTGGGAGCAAACACATCTGACCTACAGGATTGAAAATTACACGCCAGATTTG 375

Cebus apella CCAAGATCAGATGTGGACCATGCCATTGAGAAAGCCTTTCAACTCTGGAGTAATGTCACA 180
|||||
Homo sapiens CCAAGAGCAGATGTGGACCATGCCATTGAGAAAGCCTTCCAACCTCTGGAGTAATGTCACA 435

Cebus apella CCTCTGACATTACCAAGGTCCCTAAGGGTCAAGCAGACATAATGATATCTTTTGTGTCAGG 240
|||||
Homo sapiens CCTCTGACATTACCAAGGTCTCTGAGGGTCAAGCAGACATCATGATATCTTTTGTGTCAGG 495

Cebus apella GGAGATCATCAGGACAATTCTCCCTTTGATGGACCTGGAGGAAATCTTGCTCATGCTTTT 300
|||||
Homo sapiens GGAGATCATCGGGACAACTCTCCTTTTGTGATGGACCTGGAGGAAATCTTGCTCATGCTTTT 555

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

Cebus apella GTGATGAAGCAGCCCAGATGTGGAGTGCCTGATGTGGCTCGGTTTGTCTCACTGAGGGG 60
Homo sapiens GTGATGAAGCAGCCCAGATGTGGAGTGCCTGATGTGGCTCAGTTTGTCTCACTGAGGGG 60
*****

Cebus apella AACCCCTCGTTGGGAGAAAACACATCTGACCTACAGGATTGAAAATTACACTCCAGATTTG 120
Homo sapiens AACCCCTCGCTGGGAGCAAACACATCTGACCTACAGGATTGAAAATTACACGCCAGATTTG 120
*****

Cebus apella CCAAGATCAGATGTGGACCATGCCATTGAGAAAGCCTTTCAACTCTGGAGTAATGTCACA 180
Homo sapiens CCAAGAGCAGATGTGGACCATGCCATTGAGAAAGCCTTCCAACCTCTGGAGTAATGTCACA 180
*****

Cebus apella CCTCTGACATTACCAAGGTCCCTAAGGGTCAAGCAGACATAATGATATCTTTTGTGTCAGG 240
Homo sapiens CCTCTGACATTACCAAGGTCTCTGAGGGTCAAGCAGACATCATGATATCTTTTGTGTCAGG 240
*****

Cebus apella GGAGATCATCAGGACAATTCTCCCTTTGATGGACCTGGAGGAAATCTTGCTCATGCTTTT 300
Homo sapiens GGAGATCATCGGGACAACTCTCCTTTTGTGATGGACCTGGAGGAAATCTTGCTCATGCTTTT 300
*****

```

MMP-2**Homologia entre mRNA (MMP-2) humano e de macaco Cebus apella – 96%**

Cebus apella	GTTCTCCAGCTTCAGGTAATAGGCACCCTTGAAGAAGTAGCTGTGACCGCTACCCTGCAG	60
Homo sapiens	 GTTCTCCAGCTTCAGGTAATAGGCACCCTTGAAGAAGTAGCTGTGACCGCGCCCTGCAG	2171
Cebus apella	GTCCACGACGGCATCTAGGTTATCGGGAATGGCATTCCAGGCATCCGCGATGAGCTTGGG	120
Homo sapiens	 GTCCACGACGGCATCCAGGTTATCGGGGATGGCATTCCAGGCATCTGCGATGAGCTTGGG	2111
Cebus apella	GAAGCCAGGATCCATTTTCTTCTTCACTTCATTGTATCTCCAGAATTTGTCTCCAGCAAA	180
mRNA humano	 GAAGCCAGGATCCATTTTCTTCTTCACTTCATTGTATCTCCAGAATTTGTCTCCAGCAAA	2051
Cebus apella	GATGTATGTCTTCTTGTCTTGTCTTCCAGTTAAAGGCAGCATCCACTCTCTGGACATCAGG	240
Homo sapiens	 GATGTATGTCTTCTTGTCTTGTCTTCCAGTTAAAGGCAGCATCCACTCGCTGGACATCAGG	1991
Cebus apella	GGGCAGTCCCAAGCTGGTCAGTGGCTTGGGATACCCTCGCTCCAGGGTGCTGGCTGAGTA	300
Homo sapiens	 GGGCAGTCCCAAGCTGGTCAGTGGCTTGGGATACCCTCGCTCCAGGGTGCTGGCTGAGTA	1931

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

Homo sapiens	GTGATGAAGCAGCCCAGATGTGGAGTGCCTGATGTGGCTCAGTTTGTCTCACTGAGGGG	60
Cebus apella	GTGATGAAGCAGCCCAGATGTGGAGTGCCTGATGTGGCTCGGTTTGTCTCACTGAGGGG	60

Homo sapiens	AACCTTCGCTGGGAGCAAACACATCTGACCTACAGGATTGAAAATTACACGCCAGATTTG	120
Cebus apella	AACCTTCGTTGGGAGAAAACACATCTGACCTACAGGATTGAAAATTACACTCCAGATTTG	120

Homo sapiens	CCAAGAGCAGATGTGGACCATGCCATTGAGAAAGCCTTCCAACCTCTGGAGTAATGTCACA	180
Cebus apella	CCAAGATCAGATGTGGACCATGCCATTGAGAAAGCCTTCCAACCTCTGGAGTAATGTCACA	180

Homo sapiens	CCTCTGACATTACCAAGGTCTCTGAGGGTCAAGCAGACATCATGATATCTTTTGTGAGG	240
Cebus apella	CCTCTGACATTACCAAGGTCCCTAAGGGTCAAGCAGACATAATGATATCTTTTGTGAGG	240

Homo sapiens	GGAGATCATCGGGACAACTCTCCTTTTGATGGACCTGGAGGAAATCTTGCTCATGCTTTT	300
Cebus apella	GGAGATCATCAGGACAATTCTCCCTTTGATGGACCTGGAGGAAATCTTGCTCATGCTTTT	300

ANEXO IX

Tabela 2. Características dos animais e doses individuais dos medicamentos, a partir do oitavo dia de tratamento.

Animal	Idade*	Peso (kg)	Grupo	DOSE/DIA (mg)	IG/ISS Controle	IG/ISS 52 dias	IG/ISS 120 dias
1	Subadulto	2,040	fenitoina	30,6	2/ 4		1 /2
2	Subadulto	1,850	ciclosporina	27,75	1/ 3	2 /1	
3	Subadulto	2,110	ciclosporina	31,65	1/2		1/2
4	Subadulto	2,300	ciclosporina	34,5	2/2		2/2
5	Adulto	2,920	ciclosporina	43,8	1/1	1 /1	
6	Subadulto	2,250	nifedipina	90	1/2		1/2
7	Subadulto	1,890	nifedipina	75,6	2/2		1/1
8	Subadulto	1,660	fenitoina	24,9	2/2	1 /1	
9	Subadulto	2,110	fenitoina	31,65	1/2		2/2
10	Adulto	2,220	fenitoína	33,3	1/ 2	1 /1	
11	Adulto	2,450	nifedipina	98	1/2	1 /2	
12	Subadulto	1,540	nifedipina	61,6	2/2	1 /1	

IG=Índice Gengival; ISS=Índice de Sangramento de Sulco

* Critérios de Gilmore (FREESE; OPPENHEIMER, 1981)