



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

**Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP
Departamento de Ciências Básicas
Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

RODRIGO DAS NEVES CANO

**PAPEL DA MMP-9 E DO TGF- β NA EXPRESSÃO DE COMPONENTES DA
MATRIZ EXTRACELULAR POR FIBROBLASTOS GENGIVAIS DE
CAMUNDONGOS NORMAIS E DIABÉTICOS COM DOENÇA PERIODONTAL *IN*
*VITRO***

Araçatuba - SP

2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP
Departamento de Ciências Básicas
Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

RODRIGO DAS NEVES CANO

**Papel da MMP-9 e do TGF- β na expressão de componentes da Matriz
Extracelular por fibroblastos gengivais de camundongos normais e
diabéticos com doença periodontal *in vitro***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Unesp, como parte parcial dos requisitos para a obtenção do título de "Mestre em Ciências Fisiológicas".

Orientadora: Profa. Tit. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira

Araçatuba – SP

2019

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

C227p Cano, Rodrigo das Neves.
Papel da MMP-9 e do TGF- β na expressão de componentes da matriz extracelular por fibroblastos gengivais de camundongos normais e diabéticos com doença periodontal in vitro / Rodrigo das Neves Cano. - Araçatuba, 2019
76 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientadora: Profa. Sandra Helena Penha de Oliveira

1. Doenças periodontais 2. Diabetes mellitus 3. Fibroblastos
I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

RODRIGO DAS NEVES CANO

NASCIMENTO: 27 DE JULHO DE 1986

LOCALIDADE: NOVA GRANADA - SP

FILIAÇÃO: REGINA MARIA NEVES CANO

JAIR CANO

VIDA ACADÊMICA

2005 - 2008 – GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM PELA FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – FAMERP, SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP

2017-2019 – MESTRANDO DO PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, INSTITUIÇÃO ASSOCIADA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA – FOA/UNESP, ARAÇATUBA - SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, alicerce do meu ser – meus pais Jair e Regina e meus irmãos, Josiane e Renato.

AGRADECIMIENTOS

Agradeço imensamente a Deus, força suprema, que tem regido meu ser e me trouxe para este lugar, me dando oportunidades e iluminando meu caminho e minhas decisões;

Gratidão eterna à minha orientadora, Prof. Sandra, que me abriu as portas do seu laboratório e acima de tudo, apesar das intempéries, confiou em mim e no meu trabalho;

Agradeço a minha família, por me educarem, por sempre acreditarem em mim, pelos sacrifícios que tiveram que fazer para que hoje eu esteja onde estou e por entenderem minha ausência;

Agradecimento especial á Prof. Cristina e á Prof. Dóris, pelos ensinamentos e pela contribuição neste trabalho, quando aceitaram fazer parte da minha banca no meu Exame Geral de Qualificação, junto à minha orientadora;

Agradeço imensamente às professoras Dra. Letícia e Dra. Carla, por terem sido parte da Banca Examinadora da minha Defesa desta Dissertação, as quais contribuíram grandemente com ideias e sugestões;

Agradeço aos outros professores do Programa, Prof. Rita de Cássia, Prof. Ana Cláudia, Prof. Antônio, Prof. Cristina e Prof. Dóris, que sempre se fizeram presentes no nosso cotidiano e que trabalham incansavelmente pelo progresso e manutenção do nosso programa de pós-graduação;

Agradecimento mais que especial aos primeiros “professores” que tive no laboratório, Aline Takamyia e Victor Balera, que me ensinaram as primeiras técnicas e protocolos, vocês me deram força para não desistir no início;

Gratidão às alunas de Iniciação Científica Milena e Bianca, pela parceria e pela ajuda sempre que precisei, me ajudando na indução de diabetes e de doença periodontal, nas rotinas de biotério e no dia-a-dia;

Agradeço à nossa técnica de Biologia Molecular Beatriz, que nesse período, foi muito mais do que isso, sendo sempre disponível, eficiente e empática;

Gratidão aos outros alunos de iniciação científica do laboratório, Maria Carolina, Cau, Mariana e José Victor, que mesmo indiretamente me ajudaram e propiciaram um caminho mais tranquilo e mais organizado até minha chegada a este momento;

Agradecimento aos colegas de bancada - e de muitas histórias – que fizeram nosso dia a dia mais leve e nossa convivência mais divertida, além de terem respeitado sempre meu espaço e minha trajetória, Sabrina, Ayná, Kellen e os outros já citados.

Agradecimento também aos nossos colegas da “Farmaco A”, Jéssica Troiano, Murilo, Jéssica, Heitor, Emily e Priscila, que sempre estiveram dispostos a ajudar, em tudo que precisei, e que também contribuíram para um dia-a-dia mais alegre e proveitoso no nosso laboratório;

Agradeço imensamente a Seção técnica de pós-graduação, na pessoa das queridas Valéria e Cristiane, pela força e paciência, sempre que precisei;

Gratidão aos animais que foram sacrificados neste período para que esta pesquisa se fizesse, e pela manutenção da ciência nesta instituição, só Deus sabe como essa parte do trabalho é dura para um amante de animais, como eu;

Aos meus amigos, Eduardo e Viviane, que me respeitaram e sem entenderam meus não comparecimentos á eventos, meus esquecimentos, e as horas que dediquei a este trabalho e não a eles, quero que saibam o quanto vocês foram importantes nessa trajetória, me mantendo sempre de pé e cuidando de mim, quando ninguém mais pode;

Ao, hoje amigo, Richard, com quem dividi não só um lar, mas minha vida, por praticamente todo meu período neste curso, pelas horas que passei estudando e trabalhando, pelo apoio incondicional, pelo interesse no meu projeto, você sempre será parte disso;

Aos meus amigos distantes e às suas famílias, Aline, Fernanda, Juliana, Aline Cumpris e Camila, que mesmo de longe sempre me incentivaram e torceram pelo meu sucesso;

Aos meus amigos que um dia conheci no trabalho, mas carregamos sentimentos de irmãos ao longo desses anos todos, Larissa, Bárbara, Patrícia, Roberta e Micheli, que também sempre torceram pelo meu sucesso e sempre acreditaram no meu potencial;

Aos colegas e amigos do SAMU de Araçatuba, Michelli, Mirela, Fábio e tantos outros que sempre entenderam minhas faltas, minhas horas de estudo durante os plantões nas quais poderíamos estar convivendo, mas que sempre estiveram ao meu lado e acreditam no meu sucesso;

Agradecimento especial a esta Faculdade, que me acolheu, e me ofereceu espaço e oportunidades para trilhar meu caminho;

E por fim, agradeço às entidades CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro, e por acreditar nos nossos projetos.

“Eu faço parte dos pensam que a Ciência tem grande beleza. Um cientista em um laboratório não é apenas um técnico, ele é também uma criança diante de fenômenos naturais que o impressionam como num conto de fadas”.

Marie Curie (1867-1934)

RESUMO

CANO, R. N. **Papel da MMP-9 e do TGF- β na expressão de componentes da Matriz Extracelular por fibroblastos gengivais de camundongos normais e diabéticos com doença periodontal *in vitro***. Dissertação (Mestrado) – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Universidade Estadual Paulista. Araçatuba, SP 2019.

Na presença de Diabetes Mellitus, a doença periodontal (DP) pode acentuar o aparecimento de complicações e aumentar sua prevalência. O objetivo desta pesquisa foi avaliar se o Fator de Crescimento Transformador - β do tipo 1 (TGF- β 1, sigla em inglês) e Metaloproteinase de matriz -9 (MMP-9, sigla em inglês) estão modulando a formação de componentes de matriz extracelular em fibroblastos gengivais (FG) de camundongos diabéticos e com DP. Os 24 animais foram separados em 4 grupos, e então foram tratados com estreptozotocina para indução de diabetes e foi realizada indução da DP através de ligadura com fio de seda. Após a eutanásia e coleta da gengiva, FG dos camundongos foram cultivados. A expressão gênica de RNAm e produção de proteína para MMP-9, TGF- β 1 e colágeno tipo 1 (Col1a1) foram avaliadas. Eles também foram tratados com inibidores de MMP-9 e TGF- β 1, e dexametasona (Dexa) por 24h. FG de animais normais e diabéticos com DP induzida tiveram expressão aumentada de MMP-9 e TGF- β 1 em 6 e 24h, diminuindo em 48h. Expressão gênica de Col1a1 foi diminuída em FG com DP em 6, 24 e 48h. Inibidor de MMP-9 (MMP-9i) bloqueou a expressão gênica de MMP-9 e de TGF- β 1 em FG normais e diabéticos em 24h. A expressão de col1a1 foi inibida pelo MMP-9i somente em FG normais, mas não em diabéticos. A expressão de receptor de TGF- β do tipo 1 (TGF- β R1) foi aumentada em FG normais e diabéticos, porém MMP-9i diminuiu esta expressão somente em FG diabéticos. Inibidor de TGF- β (SB431542) e Dexa interromperam a expressão gênica de MMP-9, TGF- β 1 e col1a1 em FG normais e diabéticos com DP em 24h. TGF- β R1 também foi inibido em FG normais e diabéticos com DP em 24h de tratamento com SB431542. Juntos, esses achados sugerem que indivíduos diabéticos têm síntese aumentada de TGF- β e MMP-9 em FG durante a DP devido a ativação do TGF- β R1 via ALK5 e presença de MMP-9. Por outro lado, o aumento na expressão de colágeno é devido a ativação de TGF- β R1 em FG normais e diabéticos, e presença de MMP-9 em FG normais, somente. **Palavras-chave:** doença periodontal, diabetes mellitus, fibroblastos.

ABSTRACT

CANO, R. N. **Role of MMP-9 and TGF- β on extracellular matrix components expression by in vitro fibroblasts from normal and diabetic mice with periodontal disease.** Dissertação (Mestrado) – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Universidade Estadual Paulista. Araçatuba, SP 2019.

In presence of Diabetes Mellitus, periodontal disease (PD) can accentuate complication appearance and increase prevalence. The aim of this study was to evaluate whether Transforming Growth factor- β 1 (TGF- β 1) and Matrix Metaloproteinase-9 (MMP-9) are modulating the extracellular matrix components in gingival fibroblasts (GF) from diabetic mice (D) with PD. 24 animals were divided in 4 groups then they were treated with streptozotocin to diabetes induction and DP was induced through a ligature with silk thread. After euthanasia and gingiva harvest, mice GF were cultured. MMP-9, TGF- β 1, and type 1 Collagen (col1a1) mRNA expression and protein production were evaluated. They were also treated with MMP-9 and TGF- β inhibitors, and dexamethasone (Dexa) for 24h. Normal and diabetic GF from PD-induced mice had increased MMP-9 and TGF- β 1 expression at 6 and 24 h decreasing at 48 h. Col1a1 gene expression was decreased in normal GF with PD at 6, 24 and 48 h. In diabetic GF col1a1 expression was inhibited at 6, 24 and 48 h. MMP-9 inhibitor (MMP-9i) blocked the MMP-9 expression, and TGF- β 1 gene expression in normal and diabetic GF at 24 h. The col1a1 gene expression was inhibited by MMP-9i only in normal GF but not in diabetic. TGF- β R1 was increased in normal and diabetic GF with PD, but MMP-9i decreased this expression only in diabetic GF. TGF- β inhibitor (SB431542) and Dexa abrogated MMP-9, TGF- β 1 and col1a1 expression in normal and diabetic GF with PD at 24 h. TGF- β R1 was also inhibited in normal and diabetic GF with PD after 24 h of treatment with SB431542. Taken together, these findings suggests that diabetic individuals has increased synthesis of TGF- β and MMP-9 in GF during PD due to TGF- β R1 activation via Alk5 and presence of MMP-9. On the other hand, increased in the col1a1 expression is due to TGF- β R1 activation in normal and diabetic GF and presence of MMP-9 in normal GF.

Keywords: periodontal disease, diabetes mellitus, fibroblasts.

LISTA DE ABREVIÇÕES

DP	Doença Periodontal
DP-ind	Doença periodontal induzida por ligadura
DM	Diabetes Mellitus
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TGF- β	Fator de crescimento transformador β (siga em inglês)
TGF- β R1	Receptor para TGF- β do tipo 1
ALK5	Activin Like Receptor – 5, subfamília do TGF- β R1
AGE	Produtos finais de glicação avançada
RAGE	Receptores para AGE
HbA1c	Hemoglobina glicosilada (subtipo de hemoglobina usada em exames cromatográficos para dosagem de índice de glicemia)
N-terminal	Extremidade de cadeia de polipeptídios terminada em grupo amino
C-terminal	Extremidade de cadeia de polipeptídio terminada em grupo carboxi
ERK	Sigla em inglês para quinase regulada por sinal extracelular
p38 MAPK	Proteína quinase p38 ativada por mitógeno
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
PI3K/Akt	Quinase fosfatidilinositol-3
NF κ B	Quinase de fator nuclear B
GDF-8 -9 -11	Sigla em inglês para Fatores de crescimento e diferenciação
mRNA	RNA mensageiro

SUMÁRIO

1. Introdução	22
2. Objetivos	30
Objetivos específicos.....	30
3. Materiais e métodos	33
3.1. Animais.....	33
3.2. Indução da DM nos camundongos.....	33
3.3. Indução da DP nos camundongos.....	34
3.4. Coleta da gengiva de camundongos.....	35
3.5. Cultura Primária de fibroblastos gengivais.....	36
3.6. Tratamento com inibidores farmacológicos.....	37
3.7. Imunofluorescência.....	38
3.8. Hematoxilina-eosina.....	39
3.9. Isolamento de mRNA, TR e RT-PCRq.....	39
3.10. ELISA.....	41
3.11. Viabilidade e proliferação celular.....	42
3.12. Análise estatística.....	43
4. Resultados	44
4.1. Verificação clínica da DM induzida em camundongos.....	45
4.2. Caracterização de FG em cultura primária de tecido gengival de camundongos.....	48
4.3. Análise da expressão gênica de colágeno e expressão gênica e produção de MMP-9 e TGF- β 1 em FG normais e diabéticos, de animais com DP, em tempo-resposta.....	50
4.4. Fibroblastos gengivais se mantiveram viáveis e com proliferação normal após tratamento com inibidores.....	52
4.5. Efeitos da inibição da MMP-9 na expressão gênica de colágeno, na expressão gênica e produção de MMP-9 e TGF- β 1, e na produção de TGF- β R1.....	53
4.6. Efeito da inibição do receptor de TGF- β 1, ALK5, sobre a expressão gênica de colágeno, expressão gênica e produção de MMP-9 e TGF- β 1, e sobre a produção de TGF- β R1.....	56
4.7. Efeito do uso da Dexametasona sobre a expressão gênica de colágeno, e sobre a expressão gênica e produção de MMP-9, TGF- β e produção de TGF- β R1 em fibroblastos gengivais normais e diabéticos com DP	58
5. Discussão	60
6. Conclusão	71
6. Referências Bibliográficas	72

JNTRDUÇÃO

1. Introdução

A Doença periodontal (DP) é uma doença multifatorial caracterizada por condições inflamatórias crônicas da gengiva, osso e ligamento periodontal. A DP se inicia com a gengivite, uma inflamação localizada da gengiva, após a formação de placa dental, que nada mais é do que biofilme microbiano que se forma no dente e gengiva. Este biofilme possui microrganismos que estimulam continuamente o tecido adjacente. A gengivite não tratada progride para a perda da gengiva, osso e ligamento, o que cria as “bolsas” periodontais, que são os principais sinais da doença periodontal e pode levar à perda dos dentes (Kinane et al., 2017). Fatores de risco como higiene oral precária, predisposição genética, fumo e doenças sistêmicas como Hipertensão Arterial Sistêmica e Diabetes Mellitus (DM) acentuam o aparecimento de complicações e a prevalência desta doença (Lala e Papapanou, 2011; Sonnenschein e Meyle, 2015).

A resposta local na DP é caracterizada por produção desregulada de mediadores inflamatórios e enzimas, como interleucinas, citocinas, prostaglandinas, fatores de crescimento, metaloproteinases de matriz, entre outros (Llambés et al, 2015). Apesar da causa primária da DP ser uma infecção bacteriana seguida de liberação de mediadores inflamatórios, na presença de doenças sistêmicas como DM, existem alterações imunes que pioram a resposta do hospedeiro, contribuindo para o aumento da intensidade da DP (Lala e Papapanou, 2011; Casanova et al, 2014). DM tem sido um dos maiores fatores de risco estudados devido seu papel potencial no aumento de complicações na DP, e a sua dificuldade de controle de tratamento da doença (Lala e Papapanou, 2011; Sonnenschein e Meyle, 2015; Llambés et al, 2015; Casanova et al, 2014).

A DM é uma doença que se caracteriza por destruição e/ou disfunção de células beta pancreáticas, resistência insulínica, e está muitas vezes relacionada com dislipidemias e obesidade, resultando num estado de hiperglicemia. Após a hiperglicemia, os pacientes com DM estão susceptíveis às complicações crônicas. A DM atinge cerca de 425 milhões de pessoas em todo o mundo (IDF, 2017). Só no Brasil existem 16 milhões de pessoas vivendo com a doença, e os números têm mostrado um aumento muito significativo nos últimos dez anos, cerca de 65%, obnubilando as perspectivas para o panorama da DM no Brasil e no mundo (IDF, 2017). Novas estratégias baseadas em recentes evidências enfatizam o controle da doença além do controle glicêmico somente. Os sintomas mais comuns da DM são: poliúria, polifagia e polidipsia, além de perda de peso, entre outros, porém a principal preocupação dos especialistas reside no potencial deste problema crônico de saúde pública em causar complicações que impactam diretamente na força produtiva de uma população cada vez mais jovem acometida (ADA, 2018)

Muito se tem evidenciado nos últimos anos sobre influência da DP em pacientes vivendo com diabetes. Estudos têm demonstrado que pacientes com DP severa tem mais dificuldade para controle glicêmico, ou seja, apresentam níveis de glicemia de jejum acima de 200 mg/dL e HbA1c > 9%. Além disso, o aumento de citocinas inflamatórias no sistema circulatório de pacientes com DM e DP, tem sido relacionado hipoteticamente com a incidência de resistência insulínica periférica, o que pode levar e/ou agravar o estado da DM. Há também evidências que relacionam a DP em pacientes diabéticos com o aumento da prevalência de complicações cardiovasculares, retinopatia, neuropatia e proteinúria (Preshaw et al, 2012; Casanova et al, 2014).

Por outro lado, na presença de DM, ocorrem interações não enzimáticas entre glicose ou lipídios oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos, formando os produtos finais de glicação avançada (AGE, sigla em inglês). AGE se ligam a receptores específicos (RAGE), que estão presentes em vários tipos celulares como fibroblastos, células endoteliais e células imunes, levando à diminuição da produção de colágeno, aumento da permeabilidade celular e liberação de citocinas e quimiocinas. Eles também estimulam a liberação de enzimas que degradam a matriz extracelular, causam aumento de células imunes, o que leva a aumento da atividade fagocitária no local da inflamação (Lala e Papapanou, 2011; Sonnenschein e Meyle, 2015; Sempowski et al, 1997; Javaid et al, 2017). Produção e secreção aumentada dessas citocinas inflamatórias retardam a cicatrização da mucosa oral e leva a efeitos citopáticos nas células da mucosa como fibroblastos, alterando seu comportamento (Tipton et al, 2015).

Fibroblastos são o principal e mais numeroso tipo celular no tecido gengival (Palm et al, 2017; Sempowski et al, 1997). Eles têm um importante papel na manutenção do tecido conjuntivo gengival através da síntese, remodelamento e degradação de matriz extracelular, rica em colágeno e outras proteínas estruturais, e também pela síntese de proteinases como as metaloproteinases de matriz (Almeida et al, 2015, Abel et al, 2008).

O colágeno é uma polipéptido formado de 3 principais aminoácidos: glicina, prolina e lisina, e mais dois que podem ser adicionados pós-transcricionalmente: a hidroxiprolina e a hidroxilisina. É a proteína mais abundante nos mamíferos. Promove estabilidade e flexibilidade ao tecido conjuntivo, que majoritariamente forma o tecido gengival e o ligamento periodontal. Existem 28

tipos de colágenos, porém os tipos mais comuns são o I, II, III, IV, sendo que o tipo I compreende mais de 90% de todo o colágeno encontrado no tecido gengival, embora todos eles já tenham sido identificados na gengiva. O colágeno é formado por fibroblastos em um processo que compreende tanto o meio intracelular, onde há a formação de uma molécula precursora, o pró-colágeno, e o meio extracelular, onde a molécula de pró-colágeno é clivada por peptidases na sua porção N-terminal, dando origem ao colágeno propriamente dito. Durante a DP, a síntese de colágeno é aumentada, tanto quanto a sua degradação. Cerca de 70% de colágeno do tecido conjuntivo é perdido no local da injúria (Clark e Coker, 1998; Buduneli et al, 2001; Wu e Crane, 2019).

O principal precursor para a ativação da produção de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular, é o Fator de Crescimento Transformador – β , ou TGF- β , através da ativação de receptores da superfamília deste fator de crescimento. O TGF- β é um polipeptídeo que participa de inúmeros processos biológicos que envolvem crescimento e diferenciação celular, como o desenvolvimento embrionário, diferenciação de células – tronco, além de ter papel fundamental na regulação do sistema imune, bem como na inflamação e cicatrização. Compreende uma superfamília, com mais de 30 isoformas conhecidas, sendo as mais comuns em mamíferos: o TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3.

O TGF- β 1, alvo deste estudo, assim como TGF- β 2 e o TGF- β 3 são produzidos na sua forma latente, possuindo um N-terminal mais longo, seguido de um C-terminal mais curto. A forma latente do TGF- β é clivada ainda dentro da célula, porém ainda permanece ligada à um peptídeo associado de latência (LAP, sigla em inglês), formando um pequeno complexo latente. LAP também serve

como uma chaperona, facilitando o processo de exocitose da forma latente do TGF- β na matriz extracelular através da sua ligação com proteínas específicas presente nas membranas celulares.

Após a saída para o meio extracelular, o complexo latente de TGF- β , inativo, é clivado por proteases extracelulares, ou pela ligação do LAP à proteínas da matriz extracelular como colágeno e integrinas. Dessa forma o TGF- β , na sua forma ativa, inicia diversas respostas celulares ao se ligar com diversos receptores específicos (Clark e Coker, 1998; Lifshitz e Frenkel, 2013; Chen e Dijke, 2016).

Em mamíferos, cada isoforma de TGF- β se liga a receptores de TGF- β de superfície celular do tipo serina/treonina quinase tipo I e II (TGF- β R1 e TGF- β R2). Já foram identificados 5 isoformas de receptores do tipo I e sete isoformas do receptor tipo II. Estas isoformas também são conhecidas como receptores quinases do tipo activina (ALK, sigla em inglês). O TGF- β se liga ao receptor do tipo II, porém, para que ocorra resposta, o TGF- β R2 forma um complexo com o TGF- β R1, que então é fosforilado. A sinalização do TGF- β R1 para o núcleo acontece predominantemente através de proteínas citoplasmáticas conhecidas como proteínas Smad. Estas proteínas citoplasmáticas são essenciais para a maioria, mas não para todas as respostas do TGF- β . Proteínas Smad 2/3/4 regulam a síntese e deposição de proteínas da matriz extracelular como colágeno e fibronectina (Lifshitz e Frenkel, 2013). No entanto, o TGF- β pode exercer efeitos através da ativação de vias não dependentes de proteínas Smad, também conhecidas como vias não-canônicas do TGF- β , sejam elas as vias da Erk, p38 MAPK, JNK, PI3K/Akt e outras, todas elas envolvidas no processo inflamatório, exercendo síntese de citocinas e enzimas proteolíticas. Dessa forma, o TGF- β

também influencia na degradação da matriz extracelular, através da ativação de vias que sintetizam metaloproteinases de matriz (MMPs), plasmina, inibidores teciduais de MMPs (TIMPS), participando na diferenciação e quimiotaxia de leucócitos, dentre outros (Chen e Dijke, 2016). Durante a DP, o TGF- β é aumentado, e como já visto, seus diferentes papéis entram em ação, sejam eles o fato de servir como uma citocina, estimulando o processo inflamatório, bem como sendo precursor para a síntese de componentes de matriz extracelular, mais especificamente, o colágeno. Este colágeno produzido é amplamente degradado por enzimas, como as MMPs (Kinane et al, 2017, Mize et al, 2015).

MMPs são enzimas proteolíticas de relativo peso molecular, possuindo obrigatoriamente, um domínio catalítico e um pró-domínio rico em grupamento tiol e um resíduo de cisteína. As MMPs agem degradando proteínas de matriz extracelular como colágeno, integrinas e fibronectina, porém mantêm sua atividade catalítica a proteínas de membrana, proteínas na via secretória ou no meio extracelular, por permanecerem majoritariamente ancoradas na superfície celular. São uma grande família, sendo conhecidos até hoje 24 formas distintas, em mamíferos. Seu domínio catalítico é sempre ligado a um íon de zinco (Zn^{2+}), que é seu sítio ativo, por isso o prefixo “metalo”. Normalmente, MMPs não são expressas em tecidos normais saudáveis, sendo detectados em processos de remodelamento e reparos, e tecidos inflamados (Parks et al, 2004).

A síntese de MMPs é regulado por sinais específicos a nível de transcrição. São produzidas na sua forma inativa como pró-MMPs e são mantidas assim devido a interação dos seus grupamentos zinco-dependente com um resíduo de cisteína do seu pró-domínio. A conversão em sua forma ativa se dá através da proteólise do resíduo cisteína. Após a clivagem e subsequente ativação da MMP,

esta pode ser inibida por inibidores naturais como os inibidores teciduais de MMPs (TIMPS). Durante respostas inflamatórias, substâncias oxidantes liberadas de leucócitos ou outras células podem ativar MMPs através da oxidação do grupamento tiol do pró-domínio, bem como podem inativar MMPs modificando aminoácidos que sejam essenciais para a catálise. Estes mecanismos promovem um equilíbrio da atividade proteolítica das MMPs (Parks et al, 2004). Entre todas as MMPs, grande importância tem sido dada para a MMP-9, também conhecida como gelatinase B, devido seu grande potencial no seu papel de degradação e remodelamento da matriz extracelular, e também devido seu aumento durante respostas inflamatórias (Vondoooren et al, 2013).

De posse destas informações, nosso objetivo central foi analisar a participação do TGF- β 1 e da MMP-9 na formação de componentes da matriz extracelular, em fibroblastos gengivais cultivados em cultura primária, provenientes de camundongos com e sem diabetes, e com e sem doença periodontal induzida por ligadura. Partimos do pressuposto de que, tanto o TGF- β 1, como a MMP-9 são capazes de modular a expressão e produção de componentes de matriz extracelular através de vias ainda desconhecidas, que precisarão de novos estudos para serem elucidados.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi analisar o papel do TGF- β e da MMP-9 na modulação da síntese de componentes da matriz extracelular em fibroblastos gengivais de camundongos diabéticos, com DP *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito da DP induzida por ligadura em cultura primária de fibroblastos gengivais de camundongos diabéticos, no que concerne a expressão gênica de colágeno do tipo 1a1 e expressão gênica e síntese proteica de MMP-9 e TGF- β 1.
- Analisar o papel da MMP-9 e do TGF- β 1, na síntese e produção de colágeno do tipo 1a1, MMP-9 e TGF- β 1 nestes fibroblastos gengivais;
- Analisar a expressão de TGF- β R1 por imunofluorescência nestes fibroblastos gengivais.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e métodos

3.1 Animais

Os animais usados nesta pesquisa foram camundongos Balb/c machos, na faixa de peso entre 25 -30 g, com aproximadamente 10 semanas de vida. Eles foram providenciados e mantidos pelo Biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia na Universidade Estadual Paulista. Os camundongos foram alimentados com ração própria e água *ad libitum*, mantidos em caixas fechadas com trocas de gases constante, dentro de salas com controle de temperatura. Vinte e quatro animais foram selecionados aleatoriamente e divididos em 4 grupos com 6 indivíduos cada: um grupo com camundongos que sofreram indução de DM e de DP; um grupo com camundongos que sofreram indução de DM; um grupo com camundongos que sofreram indução de DP; e um grupo controle. Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em experimentação animal (Protocolo FOA 01220-2017) e está de acordo com os Princípios Éticos para Experimentação Animal.

3.2 Indução da Diabetes Mellitus nos camundongos

Para a indução de DM, os camundongos receberam estreptozotocina 200mg/Kg (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), em uma única dose, via intraperitoneal. Este análogo da glicose causa destruição das células beta-pancreáticas, levando a DM nestes animais (Schneidl et al., 1994). A dose foi adaptada após estudos de padronização não publicados em nosso laboratório onde foi observado a mesma eficácia com apenas uma dose da droga ao invés de doses diárias via gavagem por sete dias. Sete dias após a indução, o nível de glicemia sanguíneo foi

mensurado coletando-se uma alíquota de sangue da extremidade da cauda do animal. Foram considerados diabéticos os animais cujo nível de glicose foi igual ou superior a 278 mg/dL (Suckow et al., 2001).

3.3 Indução de Doença Periodontal nos camundongos

Para a indução de DP, os camundongos foram anestesiados com Xilazina, dose de 6 mg/kg e Quetamina na dose de 55 mg/kg, diluídos em tampão salino fosfatado, na proporção 1-4-5 UI, respectivamente. Após o animal apresentar hipoatividade e sem vestígios de sensação dolorosa, eles receberam uma ligadura de fio de seda 4.0 (Shalon®, Brasil) bilateralmente ao redor do primeiro dente molar mandibular, numa posição submarginal, como descrito previamente (De Molon et al., 2016). A ligadura foi mantida por 14 dias e então os animais foram eutanaziados e a gengiva foi coletada.

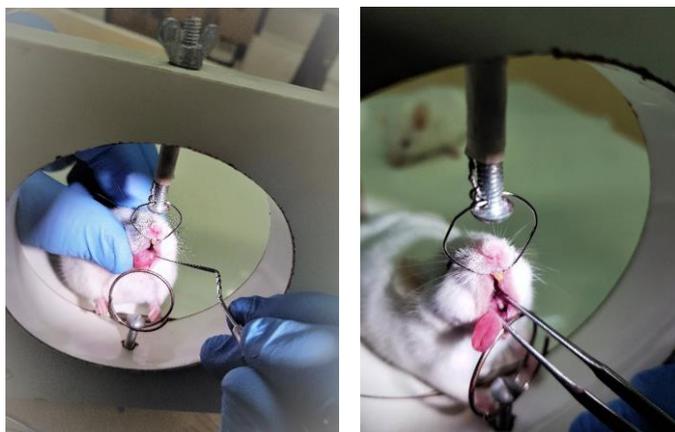


Figura 1. Procedimento de indução da doença periodontal através de ligadura com fio de seda em torno do primeiro molar mandibular. A foto A mostra o momento do afastamento dos dentes adjacentes com material dentário próprio. A foto B ilustra a ligadura já colocada e devidamente amarrada para evitar que se desloque durante os 14 dias de manutenção do estado inflamatório.

3.4 Coleta da gengiva de camundongos

Para a coleta de gengiva destes animais, os camundongos foram eutanaziados através de deslocamento cervical após anestesia. Foi realizada antissepsia da região cervical e mandibular do animal com solução de clorexidina 1%, e uma incisão foi realizada na região inferior dos incisivos mandibulares. Uma tesoura de ponta fina foi inserida no local e a mandíbula foi desconectada do tecido dermal. Realizou-se a divisão das hemi-mandíbulas direita e esquerda com o auxílio de tesoura, e após, esta foi limpa, liberando-a de tecido muscular e tendões adjacentes utilizando um bisturi nº15. Após a liberação destes tecidos, evidencia-se a gengiva como um anel fibroso e transparente em torno do dente, porém não aderido ao osso mandibular, tornando fácil a sua remoção com auxílio de uma pinça. Então a gengiva foi removida, e imediatamente processada.

3.5 Cultura primária de fibroblastos gengivais

O tecido gengival dos camundongos foi processado e os *explants* foram colocados em frascos de cultura contendo meio próprio para cultivo de fibroblastos, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, Auckland, NZ) suplementado com 15% de Soro Fetal Bovino, penicilina 1%, anfotericina B, gentamicina e L-glutamina 200mM. O meio foi trocado a cada 2 ou 3 dias. Frascos de cultura foram mantidos à temperatura de 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Fibroblastos gengivais de camundongos diabéticos tiveram o meio suplementado com 25 mM de glicose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os fibroblastos gengivais cresceram e se multiplicaram, liberando-se dos *explants*, e dez dias depois os frascos foram lavados com tampão salino, as células foram tripsinizadas e mais passagens foram realizadas para novas

garrafas. Entre 4-5 passagens, os fibroblastos foram plaqueados em placas de 24 poços com 10^5 células/poço e cresceram até atingirem 80% de confluência. Fibroblastos gengivais foram divididos em dois grupos: fibroblastos gengivais obtidos de camundongos não diabéticos (GFN) e fibroblastos gengivais obtidos de camundongos diabéticos (GFD). Fibroblastos de animais que receberam ligadura foram chamados de grupo DP-induzida.

3.6 Tratamento com inibidores farmacológicos

As células foram tratadas com os seguintes inibidores: Inibidor da enzima MMP-9, MMP-9 Inhibitor I (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) na dose de 5 μ M, Inibidor de receptor TGF- β R1, o composto SB431542, na dose de 10 μ M, e dexametasona (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), também na dose de 10 μ M. As doses deste estudo foram selecionadas após estudo de padronização não publicado, utilizando um ensaio de dose-resposta com três doses para cada substância, partindo de doses dos mesmos inibidores utilizados em outros trabalhos publicados utilizando fibroblastos ou células análogas. Depois de 24h, o sobrenadante foi coletado e o RNA total foi isolado.

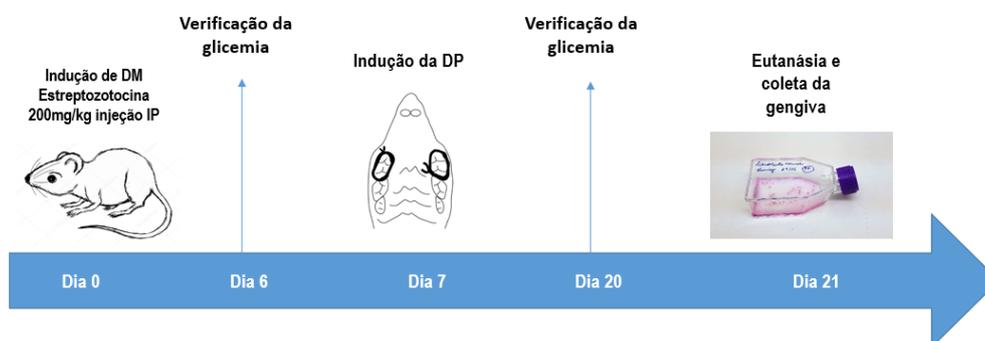


Figura 2. Desenho experimental do tratamento com os animais para a realização do estudo. As imagens do dia 0 e do dia 7 são de domínio público e foram adaptadas para uso.

3.7 Imunofluorescência

Fibroblastos gengivais foram plaqueados em lâminas de cultura de 8 poços (Corning, New York, NY, USA) e mantidos por 24h. Os tratamentos, quando pertinentes, foram realizados e após 24h, as células foram fixadas. A lâmina foi lavada com tampão salino fosfatado e as células foram fixadas com acetona por 20 min no freezer. Albumina de soro bovino (solução à 5% em PBS) foi usado para bloquear ligações inespecíficas (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 1h em temperatura ambiente. A lâmina foi lavada novamente e anticorpos primários foram adicionados em cada poço, diluídos em PBS com BSA a 1%. Actina de músculo liso murino (α -SMA; 1:100), anti-citoqueratina murino 10/13 (1:200), e proteína ativadora de fibroblasto – α de carneiro (FAP- α ; 1:100) foram usados como anticorpos primários para o ensaio de caracterização dos fibroblastos, enquanto anticorpo primário anti-TGF- β R1 (1:100) foi usado para a marcação deste receptor. Todos os anticorpos primários foram providos por Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). A lâmina de cultura foi mantida em geladeira a 4°C durante a noite. Depois de lavada com PBS novamente, anticorpos secundários foram adicionados em cada poço. Foram usados dois anticorpos secundários, o rabbit anti-goat IgG-FITC antibody (1:100; Santa Cruz, SC, CA, USA) e IgG-Dylight (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). A lâmina foi mantida por 2h em temperatura ambiente, protegido da luz direta. Meio de montagem contendo DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol; H-1200; Vector Labs, Burlingame, CA, USA) foi adicionado e a lâmina recebeu uma lamínula. As imagens foram capturadas usando um microscópio confocal invertido com sistema a laser LEICA TCS-SPE (Leica Microsystems, Mannheim, Germany).

3.8 Hematoxilina-Eosina

Para caracterização dos fibroblastos gengivais em cultura, estes foram plaqueados em placas de 24 poços e, após 24 horas, o meio de cultura foi aspirado e as células foram fixadas com formaldeído 4% por 30 min. A placa foi lavada com PBS e hematoxilina foi adicionada aos poços e mantida por 10 minutos. A placa foi lavada novamente, e então eosina foi adicionada e mantida por 3 minutos. Álcool absoluto foi adicionado aos poços e mantidos por 5 minutos, e então os poços foram lavados novamente com PBS. As fotografias foram realizadas em microscópio invertido.

3.9 Isolamento de RNA total, Transcrição Reversa e RT-qPCR

Para RT-qPCR, fibroblastos foram coletados, lisados e RNA total foi isolado de acordo com as instruções do fabricante usando reagente Trizol[®] (Invitrogen). Após a retirada do meio de cultura, foi adicionado 1 ml de reagente Trizol em cada poço. Após vigorosa raspagem do poço, o volume de Trizol foi transferido para um tubo livre de DNase e RNase, aos quais foram adicionados 200 µL de clorofórmio. Os tubos foram vigorosamente agitados por 30 segundos em vórtex, e logo após, foram mantidos em repouso à temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4^o C e 13000 rpm, por 15 minutos e as fases aquosas superiores foram recolhidas em tubos de 1,5 mL e mantidas em gelo. Para precipitação do RNA, foram adicionados 1 µL de isopropanol para cada 1 µL de fase aquosa coletada. As amostras foram mantidas durante a noite à -20°C e, após, os tubos foram centrifugados a 4°C e 12000 g, por 15 minutos, para obtenção do precipitado que posteriormente foi dissolvido em etanol à 70% e novamente centrifugados a 4°C e 10000 g, por 5 min. O

sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foi adicionado 20 μ L de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). Alíquotas de 2 μ L de cada amostra de RNA total obtido, foram diluídos em água destilada ultrapura para quantificação do RNA total. Foram consideradas leituras com comprimentos de onda de 280 e 260 nm. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado pela reação de transcrição reversa usando reagentes High Capacity cDNA Reverse Transcription kit [®] (Applied Biosystems™, Life Technologies, USA). RT-qPCR (StepOne Plus™ Real Time PCR System, Applied Biosystems, Life Technologies, UK) foi realizado utilizando o Sistema Taqman[®] com primers específicos ligadas á sondas inventoriadas com fluoróforo FAM, disponibilizados pela mesma empresa. São elas: colágeno tipo 1a1 (Col1a1 Mm00801666_g1); , MMP-9 (MMP-9 Mm00442991_m1); e TGF- β 1 (TGF- β Mm01178820_m1) e β -actina (Actb – Mm00607939), gene constitutivo, que foi usado como controle positivo. Para melhor eficiência da reação, foi realizada diluição seriada de um pool de amostras de cDNA (1:2, 1:4, 1:8, 1:16), utilizando as concentrações dos reagentes para o sistema Taqman[®] determinadas previamente. Alíquotas de 2 μ L do cDNA com os primers, na diluição 1:4 (que demonstrou mais eficiência em ciclo-resposta/amplificação), foram sintetizados a partir do RNAm juntamente com os reagentes Taqman[®] Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems Life Technologies, USA), e sondas como determinado pelo fabricante, num volume final de reação de 10 μ L. A reação de amplificação compreendeu 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, e 40 ciclos de 15 s a 95 °C por 1 min a 60 °C, conforme recomendado pela empresa. A determinação dos níveis de expressão dos genes alvo foi realizada pela quantificação relativa (RQ), utilizando-se a equação $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen 2008). Para cada gene, foi detectado um valor de

CT (cycle threshold) tanto para o gene alvo quanto para o gene endógeno, normalizador. Esse valor representa o ponto em que o sinal de amplificação é detectado. O valor do CT do gene alvo é subtraído do valor do CT do normalizador e resulta no valor de Δ CT do calibrador (grupo controle não tratado), e é então, encontrado o valor de $\Delta\Delta$ CT. Esse valor foi utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do normalizador, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência (Livak and Schmittgen 2008). Uma amostra de água foi utilizada como controle negativo.

3.10 ELISA

Produção de MMP-9 e TGF- β 1 foram mensurados pelo método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Sobrenadante foi coletado das placas de cultura primária de 24 poços depois do tratamento quando pertinente, e os níveis de proteínas foram analisados. Placas de 96 poços foram cobertas com anticorpos primários monoclonais anti-MMP-9 (1ug/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) e anti-TGF- β 1 (4 ug/mL; Duo-Set kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) diluídos em PBS e mantidos durante a noite à 4°C. Após a lavagem com PBS contendo Tween 20 (Sigma Aldrich, MO, USA) a 1%, BSA 1% diluído em PBS foi usado para bloquear ligações inespecíficas por 2 horas em temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada com PBS + Tween 20 e as amostras foram então adicionadas em cada poço e mantidas por 2h em temperatura ambiente. Procedido a lavagem novamente, e após foi adicionado anticorpo secundário ligado à biotina aos poços e mantidos por 1h protegidos da luz. TMB (3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine Liquid Substrate; Merck KGaA,

Darmstadt, Germany) pronto para uso com peroxidase foi usado como substrato por 30 min. Estreptavidina diluída em PBS foi adicionada à reação por 30 minutos. Para bloquear as reações das amostras, foi adicionado ácido sulfúrico. A placa foi lida em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 450nm. Para a normalização dos valores obtidos nas amostras, foi realizado curva padrão de acordo com as recomendações para cada anticorpo.

3.11 Viabilidade e proliferação celular

Fibroblastos gengivais foram semeados na mesma densidade dos experimentos anteriores (10^5 cells/well). Após 24h, os tratamentos foram adicionados em cada poço e mantidos à 37°C e atmosfera úmida à 5% de CO₂, e mantidos por mais 24h. O sobrenadante foi aspirado e ensaio com MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) foi realizado. A dose de 5 mg/mL foi utilizada para preparo de solução de estoque, que foi filtrada para esterilizar e filtrar pequenos resíduos insolúveis. Solução de 1:4 de MTT foi diluída em meio de cultura e adicionado a cada poço e mantido por 4h. Álcool isopropílico substituiu o MTT e após homogeneização dos cristais azul-escuro a placa foi lida em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 570nm.

3.12 Análise estatística

Os dados foram obtidos de pelo menos três séries independentes de experimentos e a análise foi realizada usando o programa estatístico GraphPad Prism (version 6.1). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM), e comparações intergrupos foram feitas usando o teste simples de

uma duas vias ANOVA, com correção de Bonferroni, onde os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Verificação clínica da Diabetes Mellitus induzida em camundongos

Os dados presentes na Fig.03 mostram que no dia 0 da indução, os animais apresentavam taxa de glicemia variável entre 154 a 210 mg/dL de sangue. Em 7 dias, estes animais apresentavam taxa de glicemia entre 349 a 600+ mg/dL, e na véspera da eutanásia, a taxa de glicemia destes animais estava entre 365 e 600+ mg/dL. Os dados reforçam que a indução da DM foi satisfatória e que ela foi mantida até o momento da coleta do tecido gengival e posterior cultura em meio hiperglicêmico.

A condição clínica dos animais também foi observada, uma vez que animais diabéticos tendem a ter comportamentos fisiológicos alterados. Assim, o comportamento alimentar, padrões de excreção, peso e pelagem foram observados e estão descritos na Tabela 01.

A Figura 04 mostra a fotografia de dois animais, um normal e um diabético, ambos sem doença periodontal, no 22^a dia de indução da DM. A imagem reforça os dados observados na tabela anterior, quanto ao importante emagrecimento, alopecia e aspecto opaco dos pelos destes camundongos.

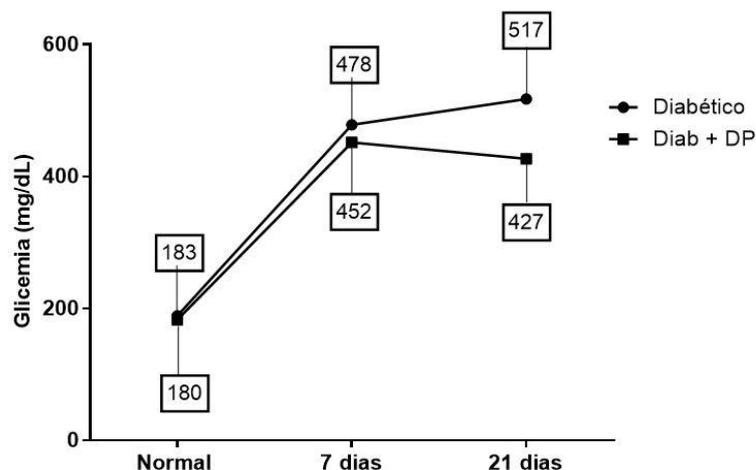


Figura 03. O gráfico mostra os níveis sanguíneos de glicemia medidos em camundongos antes e depois da indução de DM com Estreptozotocina (200mg/kg) em uma única dose intraperitoneal. Os valores nas caixas indicam o nível glicêmico médio de cada grupo experimental (n=6). Os níveis sanguíneos de glicose foram medidos no dia da indução, antes da injeção, e 7 dias depois, assim como no dia 21, antes da coleta de gengiva. Uma alíquota de sangue foi coletada da porção final da cauda do animal.

Quadro 01. Sinais clínicos observados e mensurados nos animais entre o dia 0 e o dia 21 de indução de DM e DP	
Sintomas clínicos	Evidências observadas
Hiperfagia	Animais normais comeram cerca de 13,6g de ração/semana. Animais diabéticos comeram 21,8g de ração/semana. Um aumento de 61% na ingestão de ração.
Polidipsia	Animais normais consumiram cerca de 50 ml de água/semana. Animais diabéticos consumiram cerca de 75 ml de água/semana. Um aumento de 50% no consumo de água.
Poliúria	A cama de maravalha trocada a cada dois dias, em cada caixa, tinham peso final (constituído de maravalha e excrementos) de aproximadamente 48g para caixas com animais normais. A mesma cama de maravalha, em caixas com animais diabéticos, tinham peso médio 150% maior (aproximadamente 120g), mantendo-se o mesmo número de animais em cada caixa.
Pelagem opaca	Animais diabéticos apresentaram pelagem mais opaca e queda de pelos já no terceiro ou quarto dia após a indução da DM com STZ.
Emagrecimento	A média de peso de animais normais foi de 32 gramas. Animais diabéticos apresentaram média de peso de 20 gramas 7 dias após a indução com STZ, uma redução de cerca de 37,5% do peso corporal.



Figura 4. Fotografia de camundongo no dia 0 de indução da Diabetes Mellitus (à esquerda), e de um camundongo no dia 22 de indução da Diabetes Mellitus, dia da eutanásia (à direita). Ambos animais pesavam 32 gramas no dia 0.

4.2 Caracterização de fibroblastos gengivais em cultura primária de tecido gengival de camundongos

Fibroblastos gengivais provenientes de camundongos Balb/c foram caracterizados através de técnica de imunofluorescência, microscopia óptica e também foram corados com hematoxilina-eosina. Fotografia microscópica de um microscópio invertido mostra fibroblastos gengivais aderidos ao fundo da garrafa de cultura, crescendo após quatro passagens (Fig.05A). Fibroblastos gengivais exibiram morfologia típica com citoplasma ramificado, circundando um núcleo elíptico. Isto fica ainda mais evidente ao observar a Fig.05B, onde os fibroblastos foram corados com HE. O fenótipo dos fibroblastos foi analisado usando anticorpos para actina de músculo liso murino (α -SMA), fator ativador de fibroblastos (α -FAP) e, para excluir células epiteliais, foi usado também o anticorpo para citoqueratina (anti-citoqueratina).

Na Fig.05C, podemos observar produção de actina de músculo liso (vermelho), assim como o núcleo dos fibroblastos corado com DAPI (azul). A Fig.05D mostra que FAP também foi produzido como era esperado neste estudo, apoiando o fenótipo dos fibroblastos deste estudo. Citoqueratina foi produzida em pequena quantidade, uma vez que esta proteína é comumente encontrada em epidermócitos e ainda mais em células epiteliais (Fig.05E). O resultado da reação de imunofluorescência confirma a homogeneidade destas populações de fibroblastos.

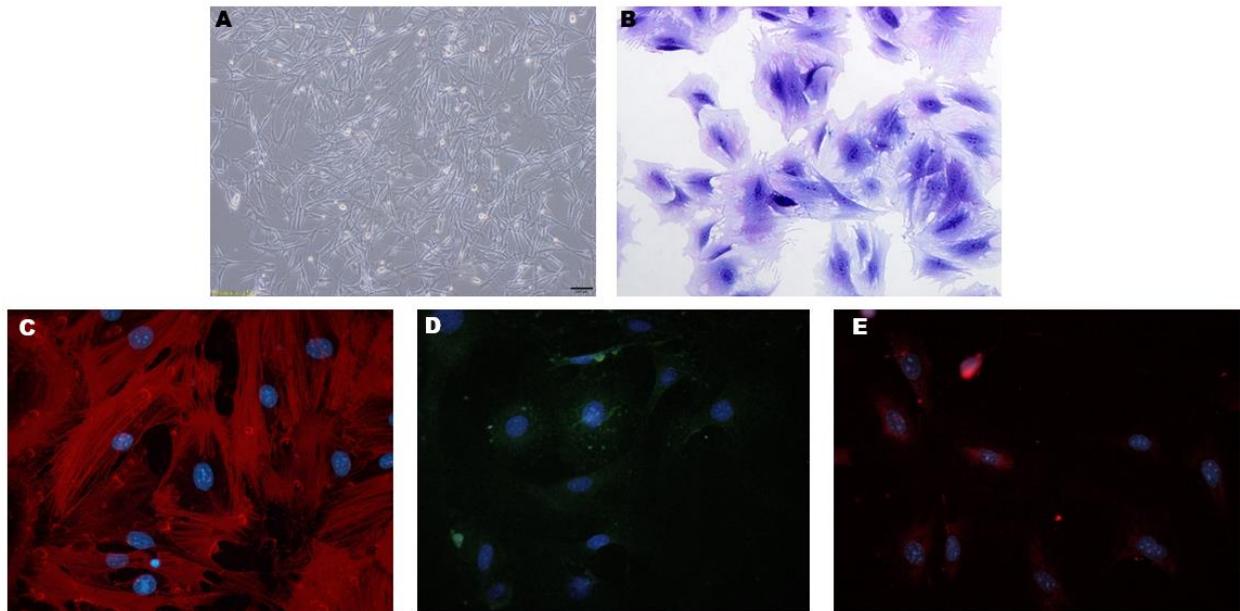


Figura 05. A) Microscopia invertida de fibroblastos gengivais de camundongos cultivados em garrafas de ciultura antes dos ensaios, visto em lente de aumento 10x. B) Coloração de fibroblastos gengivais de camundongos com HE, vistos em lente de aumento 20x C) Imunofluorescência de fibroblastos gengivais de camundongos marcados com DAPI (azul) e anticorpo α -SMA (vermelho). D) Imunofluorescência de fibroblastos gengivais de camundongos marcados com DAPI (azul) e anticorpo FAP- α (Verde). E) Imunofluorescência de fibroblastos gengivais de camundongos marcados com DAPI (azul) e anticorpo anti-citoqueratina (vermelho).. Todas as lentes de aumento para Imunofluorescência foram de 40x.

4.3 Análise da expressão gênica de colágeno e expressão gênica e produção de MMP-9 e TGF- β 1 em FG normais e diabéticos, de animais com DP, em tempo-resposta.

Foi avaliado a expressão gênica de MMP-9, que mostrou que essa enzima não é constitutivamente expressa em qualquer período avaliado, por fibroblastos gengivais de camundongos normais e diabéticos (Fig. 06A). Os grupos FGN e FGD induzidos com DP expressaram MMP-9 em 6h, atingindo um pico em 24h e diminuindo em 48h, principalmente no grupo controle de FGN. A produção de MMP-9 confirmou a expressão gênica desta enzima, seguindo o tempo resposta de expressão (Fig.06B). Nós também avaliamos a expressão gênica de TGF- β 1 de uma maneira tempo-dependente em FGN e FGD, que atingiu um pico de expressão em 24h, diminuindo em 48h (Fig.06C). A análise da produção do TGF- β 1 seguiu as mesmas características da produção de MMP-9. Em 6h, TGF- β 1 foi produzido em baixa quantidade nos grupos experimentais (Fig.06D), e então foi drasticamente aumentada em 24h, sendo mantida a produção em 48h, em FGN e FGD. Com relação á expressão gênica de colágeno 1a1, observamos que este foi expresso constitutivamente em todos os períodos, em FGN, entretanto, FGN com DP-induzida drasticamente reduziu esta expressão (Fig.06E). Na presença de DM, FGD não expressou col1a1 constitutivamente e conseqüentemente DP-ind não foi capaz de reduzir esta expressão. Porém, é possível observar uma discreta tendência ao aumento do colágeno em FGD com DP.

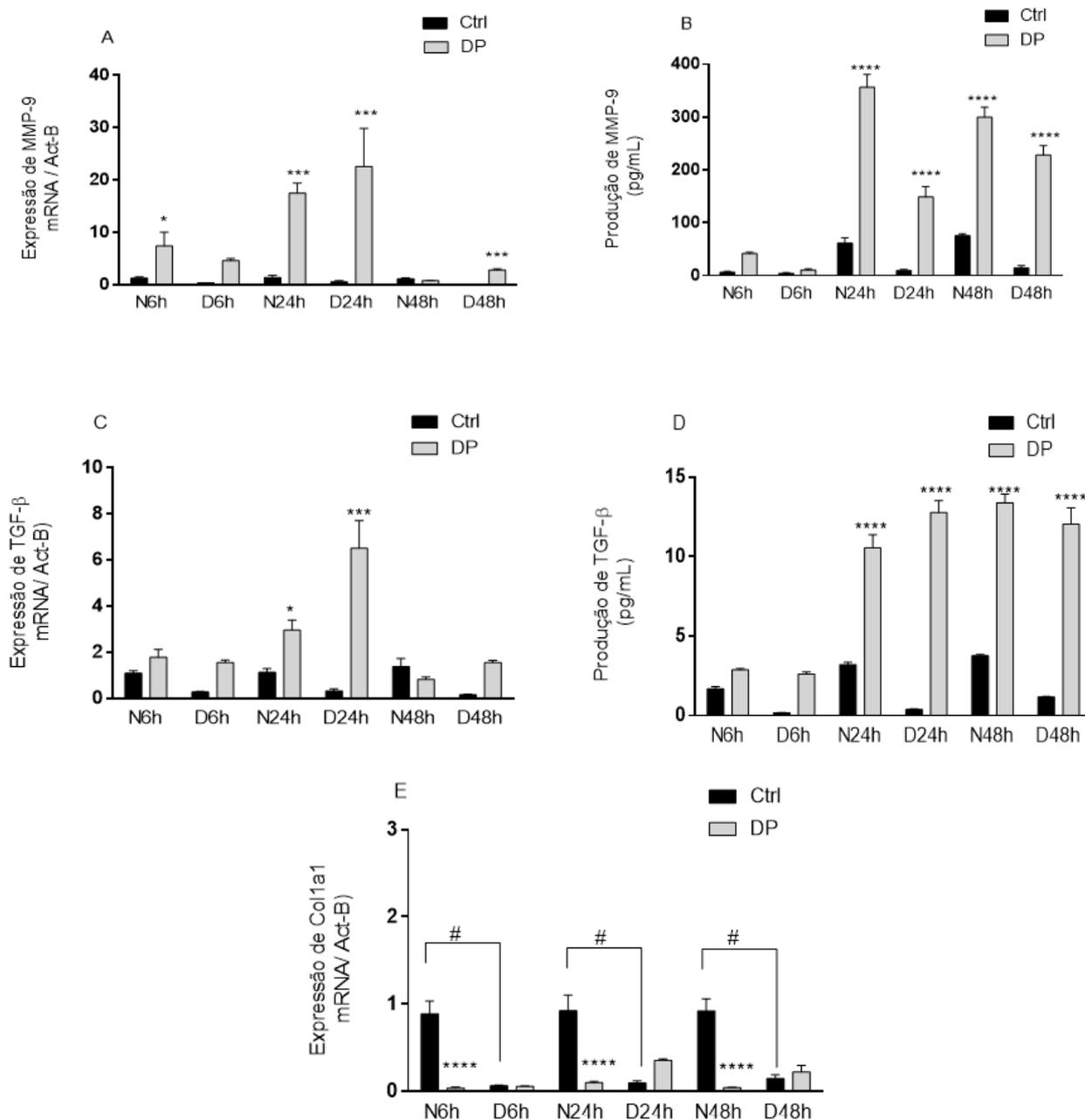


Figura 06. Análise da expressão gênica e produção de MMP-9 (A e B), expressão gênica e produção de TGF- β (C e D) e expressão gênica de Col1a1 (E), por fibroblastos gengivais de camundongos normais (N) e diabéticos (D), com (DP) ou sem doença periodontal-induzida (Ctrl), avaliados por RT-qPCR e ELISA. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média (SEM) de $n=4$ para PCR e $n=3$ para ELISA. Os dados foram analisados usando teste paramétrico Two-way ANOVA com correção de Bonferroni. Diferenças estatísticas entre grupos foram representados por: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ e **** $p<0,0001$. # $<0,0001$ comparados intergrupos.

4.4 Fibroblastos gengivais se mantiveram viáveis e com proliferação normal após tratamento com inibidores

Fibroblastos gengivais foram submetidos à tratamentos com inibidores para MMP-9, TGF- β , além de dexametasona. Todos os tratamentos demonstraram não ter nenhum efeito tóxico ou negativo na proliferação e viabilidade celular (Fig.07) nas doses utilizadas. Todos os grupos tiveram alta taxa de sobrevivência e não houve diferenças significativas entre eles.

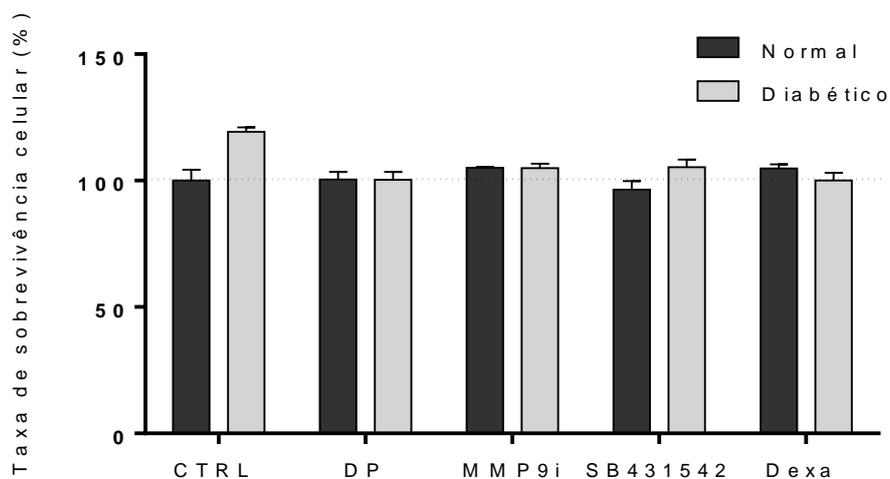


Figura 7. Fibroblastos gengivais de camundongos normais (N) e diabéticos (D), com (DP) ou sem doença periodontal-induzida (Ctrl) foram tratados com Inibidor de MMP-9 (MMP-9i; 5 μ M), Inibidor de TGF- β (SB431542; 10 μ M), e Dexametasona (Dexa; 10 μ M). Após 24h, foi realizado teste colorimétrico com MTT. Os dados foram analisados usando teste paramétrico Two-way ANOVA com correção de Bonferroni. Não houve diferenças significativas entre os grupos.

4.5 Efeitos da inibição da MMP-9 na expressão gênica de colágeno, na expressão gênica e produção de MMP-9 e TGF- β 1, e na produção de TGF- β R1.

FG com DP-induzida, tratados com MMP9i inibiu a expressão gênica de MMP-9 em culturas de FG normais e diabéticos depois de 24h (Fig.08A). MMP-9 foi vigorosamente produzido no grupo com DP-induzida (Fig.08B), porém mais em FGN que em FGD, o qual foi inibido pelo MMP-9i. Entretanto, no grupo FGD, isso não foi observado visto que MMP-9i teve somente um efeito discreto na produção de MMP-9 depois da DP. A expressão gênica de TGF- β 1 também foi analisada e os dados mostram que na presença de DP ocorreu um aumento na expressão desta que foi diminuído após o tratamento com MMP-9i em FGN e FGD, 24h após (Fig.08C). A produção de TGF- β 1 por FGN com DP foi maior quando comparada com o grupo controle, sem DP (Fig.08D), e o tratamento com MMP-9i foi capaz de reduzir esta produção. FGD mostrou um alto nível de produção de TGF- β 1 na presença de DP-ind e MMP-9i levou à inibição do TGF- β 1.

Como reportado antes, o colágeno foi constitutivamente expresso por FGN (Fig.08E). DP-ind foi capaz de diminuir esta expressão gênica e o tratamento com MMP-9i diminuiu ainda mais. Em FGD, DM inibiu a expressão constitutiva de col1a1 e a DP aumentou esta expressão. O tratamento com MMP-9i não foi efetivo na expressão de colágeno em FGD.

Na Fig.08F, nós observamos o resultado de um ensaio de imunofluorescência para receptor de TGF- β do tipo I. O grupo FGN mostrou expressão deste receptor, e a DP foi capaz de aumentar esta expressão, e MMP-

9i não foi capaz de inibi-la. Em FGD com DP-induzida nós observamos um aumento na expressão de TGF- β R1 e o inibidor de MMP-9 inibiu este.

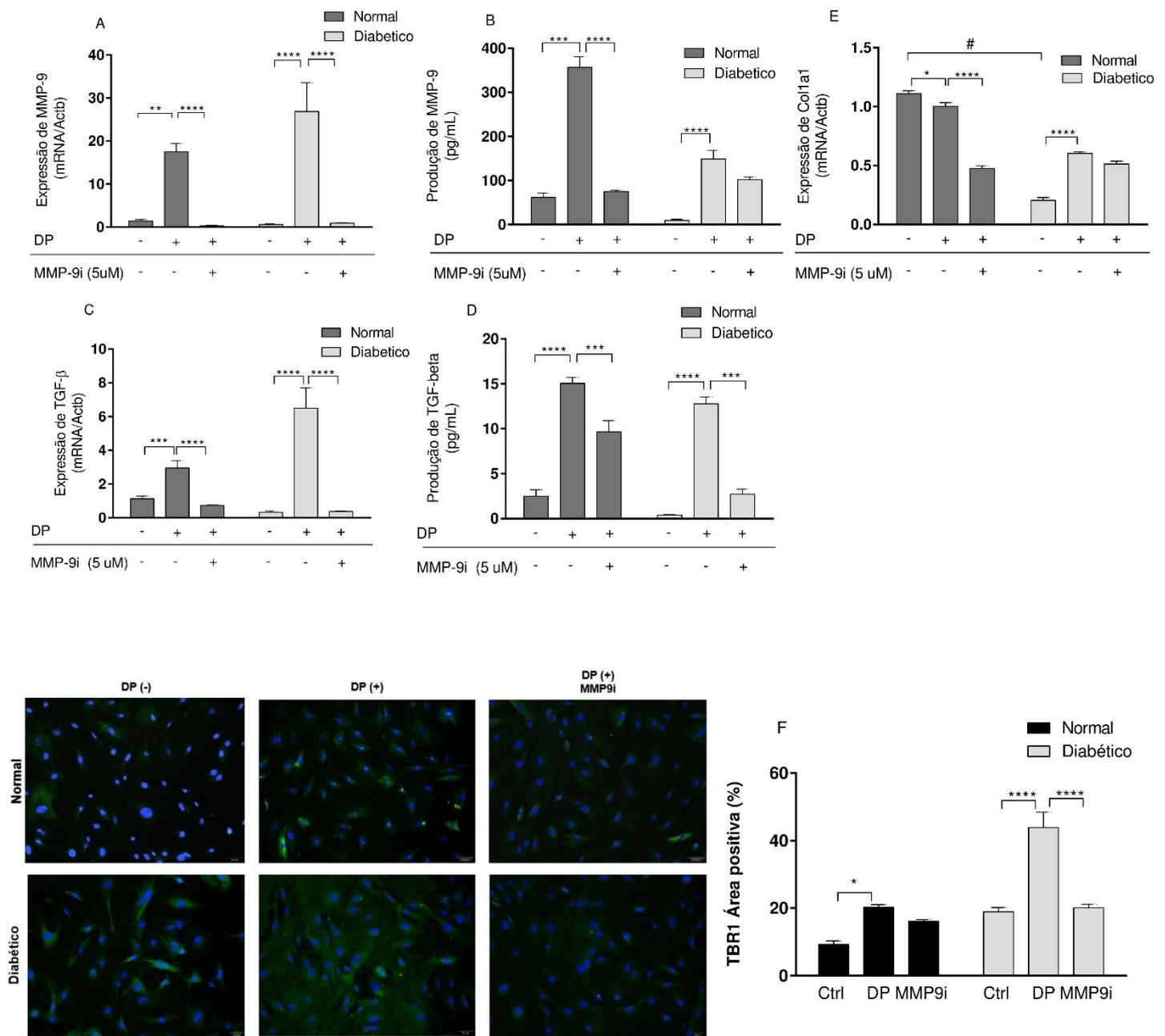


Figura 08. Análise da expressão gênica e produção de MMP-9 (A e B), expressão gênica e produção de TGF-β (C e D) e expressão de Col1a1 (E), por fibroblastos gengivais de camundongos normais e diabéticos, com (DP) ou sem doença periodontal-induzida (Ctrl), avaliados por RT-qPCR e ELISA, após serem submetidos a tratamento com inibidor de MMP-9 I (05uM). F) Ensaio de Imunofluorescência para o alvo TGF-B R1, onde se vê núcleos corados com DAPI (azul) e o alvo (verde). O gráfico mostra a quantificação da área positiva para o alvo TGF-B R1 nas imagens de imunofluorescência, realizada com uso do programa ImageJ 2.1. Todos os resultados representam a média ± erro padrão da média (SEM) de n=4 para PCR e n=3 para ELISA e IF. Os dados foram analisados usando teste paramétrico Two-way ANOVA com correção de Bonferroni. Diferenças estatísticas entre grupos foram representados por: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 e **** p<0,0001.

4.6 Efeito da inibição do receptor de TGF- β 1, ALK5, sobre a expressão gênica de colágeno, expressão gênica e produção de MMP-9 e TGF- β 1, e sobre a produção de TGF- β R1.

Os dados mostram que a MMP-9 está aumentada em FGN e FGD de animais com DP, e o inibidor de TGF- β causou uma grande inibição desta expressão gênica (Fig.09A). O inibidor de TGF- β induziu uma produção diminuída da produção de MMP-9 em FGN com DP, porém em FGD com DP, esta expressão foi sutilmente inibida pelo tratamento com o inibidor de TGF- β , sem significância estatística (Fig.09B). Expressão gênica de TGF- β 1 também foi aumentado em FGN com DP, e inibição de TGF- β levou a uma diminuição desta expressão. Na presença de DM, FGD com DP aumentou drasticamente a expressão gênica de TGF- β 1, e esta foi inibida após o tratamento com o inibidor de TGF- β (Fig.09C). A produção de TGF- β 1 foi aumentada em FGN e FGD com DP, e o inibidor de TGF- β diminuiu esta produção (Fig.09D).

Col1a1 foi constitutivamente expresso em FGN (Fig.09E). DP foi capaz de inibir esta expressão gênica. Além disso, inibidor de TGF- β foi capaz de diminuir esta expressão ainda mais. Em FGD, a presença de DM levou a expressão gênica diminuída de colágeno, e a DP causou um aumento desta. Similar ao grupo FGN, inibição de TGF- β diminuiu a expressão de colágeno. A presença de TGF- β R1 nos grupos FGN e FGD foi observada e a DP foi capaz de aumentar sua produção, enquanto o uso do inibidor de TGF- β inibiu a produção de TGF- β R1 (Fig.09F).

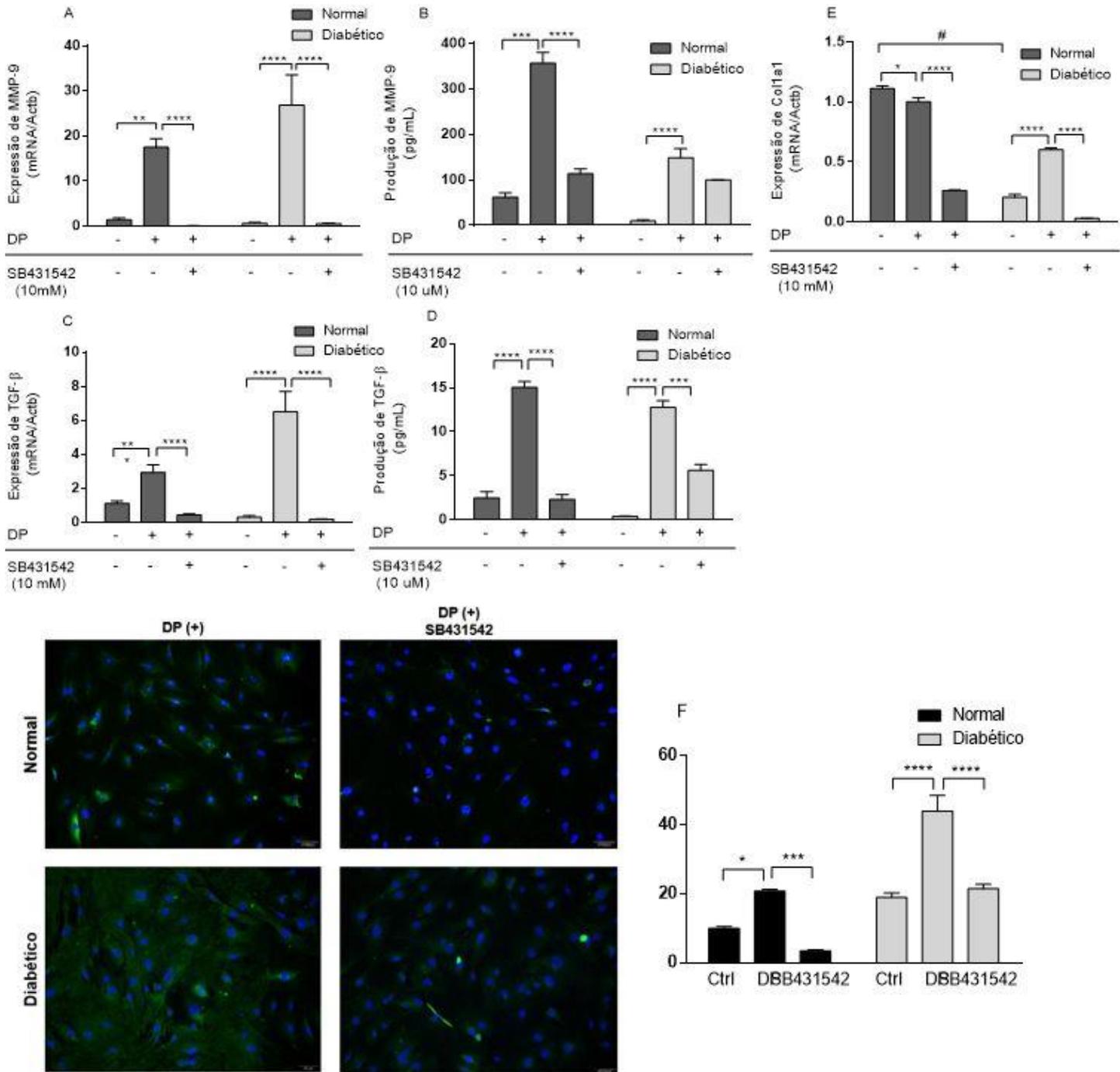


Figura 09. Análise da expressão gênica e produção de MMP-9 (A e B), expressão gênica e produção de TGF- β (C e D) e expressão gênica de Col1a1 (E), por fibroblastos gengivais de camundongos normais e diabéticos, com (DP) ou sem doença periodontal-induzida (Ctrl), avaliados por RT-qPCR e ELISA, respectivamente, após serem submetidos a tratamento com SB431542 (10 μ M). F) Ensaio de Imunofluorescência para o alvo TGF-B R1, onde se vê núcleos corados com DAPI (azul) e o alvo (verde). O gráfico mostra a quantificação da área positiva para o alvo TGF-B R1 nas imagens de imunofluorescência, realizada com uso do programa ImageJ 2.1. Todos os resultados representam a média \pm erro padrão da média (SEM) de n=4 para PCR e n=3 para ELISA e IF. Os dados foram analisados usando teste paramétrico Two-way ANOVA com correção de Bonferroni. Diferenças estatísticas entre grupos foram representados por: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 e **** p<0,0001.

4.7 Efeito do uso da Dexametasona sobre a expressão gênica de colágeno, e sobre a expressão gênica e produção de MMP-9, TGF- β e produção de TGF- β R1 em fibroblastos gengivais normais e diabéticos com DP.

Nossos resultados mostraram que a expressão gênica de MMP-9 foi aumentada nos grupos FGN e FGD com DP-induzida, e dexta foi capaz de reduzir radicalmente esta expressão (Fig.10A). Similarmente, dexta inibiu a produção de MMP-9 em FGN com DP, mas em FGD, esta inibição não foi estatisticamente significativa (Fig.10B).

A expressão gênica de TGF- β 1 foi alta em FGN e FGD com DP-induzida, e dexta reduziu esta expressão (Fig.10C). Dexta suprimiu a produção de TGF- β 1 nos grupos FGN e FGD com DP (Fig.10D). Assim sendo, é apropriado afirmar que a expressão de colágeno é dependente da produção de MMP-9 e TGF- β , visto que após a expressão gênica constitutiva de col1a1, e expressão gênica diminuída em FGN com DP, o uso de dexta drasticamente reduziu esta expressão (Fig.10E), enquanto que em FGD com DP houve uma expressão aumentada e dexta fortemente inibiu esta.

Produção de TGF- β R1 nos grupos FGN e FGD mostrou que a DP aumenta sua produção, e dexta teve efeito inibitório nesta.

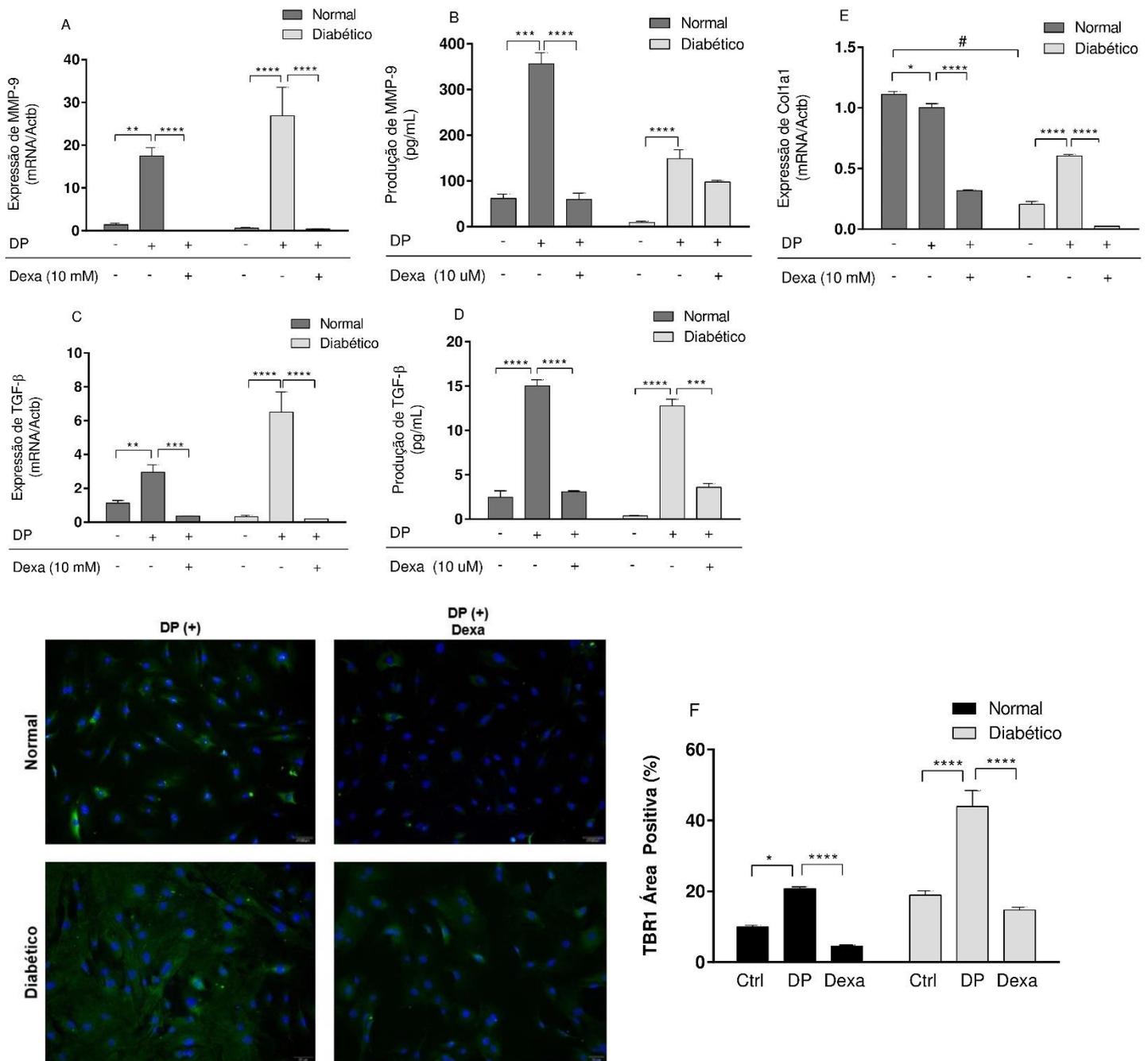


Figura 10. Análise da expressão gênica e produção de MMP-9 (A e B), expressão gênica e produção de TGF-β (C e D) e expressão gênica de Col1a1 (E), por fibroblastos gengivais de camundongos normais e diabéticos, com (DP) ou sem doença periodontal-induzida (Ctrl), avaliados por RT-qPCR e ELISA, respectivamente, após serem submetidos a tratamento com Dexametasona (10 μM). F) Ensaio de Imunofluorescência para o alvo TGF-β R1, onde se vê núcleos corados com DAPI (azul) e o alvo (verde). O gráfico mostra a quantificação da área positiva para o alvo TGF-β R1 nas imagens de imunofluorescência, realizada com uso do programa ImageJ 2.1. Todos os resultados representam a média ± erro padrão da média (SEM) de n=4 para PCR e n=3 para ELISA e IF. Os dados foram analisados usando teste paramétrico Two-way ANOVA com correção de Bonferroni. Diferenças estatísticas entre grupos foram representadas por: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 e **** p<0,0001.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que fibroblastos de tecido gengival provenientes de camundongos diabéticos e não-diabéticos, com DP induzida por ligadura, expressam MMP-9, TGF- β , colágeno tipo 1, e TGF- β R1, Visto que dexametasona, um glicocorticoide, e SB431542, um inibidor de ALK5, um receptor de TGF- β tipo I, foram capazes de inibir MMP-9, TGF- β e TGF- β R1, é razoável assumir que TGF- β e/ou citocinas podem modular a ação do TGF- β R1 via ALK5 em FG de camundongos diabéticos com DP.

A indução de DP *in vivo* foi capaz de estimular FG obtidos de camundongos normais e diabéticos, em cultura, a expressar e produzir *in vitro*, MMP-9, TGF- β , colágeno e TGF- β R1, principalmente 24h após o plaqueamento, comparado ao grupo controle. Esta estimulação foi possível uma vez que, bactérias presentes no local da lesão são capazes de liberar produtos derivados de lipopolissacarídeos de membrana e outros produtos que levam as células a produzirem mediadores inflamatórios, sensibilizando os fibroblastos locais a promoverem uma resposta inflamatória (Fitzsimmons et al, 2018; Martins et al, 2015). Análises histológicas mostraram morfologia destes fibroblastos como células alongadas, com ramificações, um núcleo ovalado, marginado e uma grande quantidade de citoplasma basófilo similar ao observado em descrições convencionais de fibroblastos. O ensaio de imunofluorescência foi usado para confirmar a pureza e características das culturas de FG, onde FAP- α e α -SMA foram observados uniformemente positivos, mas negativo para citoqueratina, excluindo contaminação com células epiteliais (Flavell et al, 2008; Somerman et al, 1988).

Fibroblastos normais estimulados pela DP exibiram um enorme potencial par aumentar MMP-9 e TGF- β , o que está de acordo com muitos autores que

descreveram o aumento destas substâncias em periodontites em humanos, modelos roedores de doença periodontal, e lesões periapicais (Mize et al, 2015; Kim et al, 2013; Li et al, 2015; Lazar et al, 2015; Álvares et al, 2017). Foi reportado que DM potencializa a liberação destes mediadores em fibroblastos, dada a presença de produtos de glicação avançada (AGE) e seus receptores (RAGE), em altas concentrações, após a exposição a um ambiente hiperglicêmico. AGE tem sido descrito como um importante modulador do processo inflamatório em diabéticos, dado seu potencial de aumentar a liberação e a produção de várias citocinas (Jiang et al, 2012; Yu et al, 2012). AGE são produtos formados durante a glicação não-enzimática de proteínas e lipídios, num estado de hiperglicemia. Eles são produtos irreversíveis, e levam ao aumento do estresse oxidativo causando danos teciduais e ativação da via do NFκB (Elenkova et al, 2019). Assim, a expressão gênica e a produção de citocinas inflamatórias e de enzimas degradadoras de matriz como as MMPs, é aumentada (Kinane et al, 2017; Kumar et al, 20016; Surlin et al, 2014). A expressão de col1a1 em FG estimulados com DP também foi observado neste estudo, em condições de hiperglicemia. Diferentemente da expressão de MMP-9 e do TGF-β, o colágeno mostrou uma grande expressão constitutiva em FG normais (Tipton and Dabbous, 1998), e em condições de hiperglicemia, ele foi inibido em todos os períodos avaliados (Ren et al, 2009). Estudos têm mencionado que DM promove diminuição da síntese de colágeno, e que este fato se relaciona com altas concentrações de AGE, em fibroblastos e células inflamatórias (Ren et al, 2009; Chang et al, 2013), o que também está de acordo com estudos que descreveram que AGE pode aumentar a produção e liberação de enzimas proteolíticas, como MMP-9, assim como, muitas citocinas (Ren et al, 2009; Abbas et al, 2012; Zheng

et al, 2018). Em fibroblastos gengivais estimulados com DP, a expressão de colágeno foi diminuída, fato similar a estudos acumulados de outros autores que descreveram que em pacientes humanos com gengivite e periodontite, a expressão de colágeno está diminuída (Almeida et al, 2015; Yakovlev et al, 1996). Por outro lado, DP-induzida aumentou a expressão de colágeno em FG sob condições hiperglicêmicas. Existem estudos controversos que reportam a síntese de colágeno em indivíduos diabéticos com DP. Alguns deles demonstraram que a DP diminui a produção de colágeno em diabéticos da mesma forma que em pacientes com gengivas saudáveis (Golub et al, 1982; Popescu et al, 2014). O resultado presente neste estudo se encontram em consonância com Ziyadeh et al, que mostrou que a síntese de colágeno estava aumentada na presença de alta concentração de glicose em meios de cultura de células mesangiais de camundongos (Ziyadeh et al, 1994). Uma das razões para este fenômeno reside no fato de que a DP pode levar ao supercrescimento e fibrose gengival devido ao aumento do TGF- β como precursor da síntese de colágeno e de seu receptor TGF- β R1. Todavia, alguns estudos têm demonstrado que em casos de DM e DP juntas, preparados histológicos mostraram esclerose de colágeno, hialinização perivascular, aumento de fibrócitos, fibras de colágeno dissociadas com bandas fragmentadas, ou seja, síntese aumentada de colágeno não-funcional (Popescu et al, 2014; Navnita et al, 2017). Em suma, o TGF- β 1, após ser liberado para o meio extracelular e ter sua forma latente clivada e ativada, atua se ligando a receptores do tipo 2, que por sua vez formam um dímero com um receptor do tipo 1 (TGF- β R1), que então é fosforilado e dá início a uma cascata de sinalização de proteínas, que incluem as proteínas do complexo Smad, sendo as Smad2/3 responsáveis por estimular, a nível nuclear após a ligação com a Smad4, a

transcrição direta de genes promotores para colágenos e outras proteínas estruturais como laminina e fibronectina, por exemplo (Lifshitz and Frenkel, 2013).

A inibição farmacológica tem se mostrado muito valiosa nos últimos anos para a elucidação de processos fisiológicos com usos de ligantes, agonistas e antagonistas, em diferentes receptores e com diferentes funções. Neste estudo, fizemos uso de um inibidor de MMP-9 e um inibidor de um receptor TGF- β R1, além da dexametasona.

O inibidor de MMP-9 I é um inibidor do ácido sulfonamida hidroxâmico de MMPs baseado no ácido antranílico. Essas moléculas mimetizam o substrato presente no sítio de ligação do colágeno, e se ligam à porção catalítica da MMP-9, onde há também os íons Zn^{2+} , inibindo a atividade desta enzima, através da substituição de um anel de fenil, presente em determinada posição da cadeia da MMP-9 (Levin et al, 2001).

MMP-9 é uma das mais abundantes MMP no tecido (Franco et al., 2017). Em nosso estudo, nós detectamos que a expressão e produção de MMP-9 estava aumentada igualmente nos grupos FGN e FGD com DP, o que está de acordo com Kumar et al., que demonstrou que tecido gengival humano expressa e produz uma alta quantidade de MMP-8 e -9 na presença de DP (Kumar et al, 2006). Na presença de DM, existe uma razão a mais para explicar os níveis de MMP-9 encontrados. Hiperglicemia pode diminuir a expressão de inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz (TIMPS, sigla em inglês), que são inibidores naturais das MMPs, presentes no próprio tecido conjuntivo, e isso pode aumentar os níveis de MMP-9 no tecido gengival devido a este desequilíbrio na proporção TIMPS/MMPs (Bastos et al., 2017). Assim, o estado de hiperglicemia secundário à diabetes pode levar ao aumento da severidade da DP, acentuando a

destruição do tecido periodontal. Além disso, a MMP-9 modula a expressão de TGF- β 1 e TGF- β R1 uma vez que o inibidor de MMP-9 foi capaz de diminuir estas expressões principalmente em condições de hiperglicemia. Entretanto essa redução foi parcial, sugerindo que outros ligantes do TGF- β R1 podem modular a expressão do colágeno - que não foi afetada pela inibição de MMP-9 na hiperglicemia – em FG com DP na diabetes, como o GDF8, GDF9a e GDF11 que são fatores de crescimento e diferenciação (Heldin e Moustakas, 2016). Além disso, produção e ativação de MMP-9 através do TGF- β R1 tem sido reportada nos últimos anos. Um estudo realizado com astrócitos de ratos encontrou que MMP-9 é inibida na presença de ligante de TGF- β R1, e ainda sugere que existe uma correlação entre a quantidade de MMP-9 e de TGF- β nestas células (Hsieh et al, 2010). Outro estudo com células metastáticas de pulmões, descobriu que o silenciamento de TGF- β no microambiente tumoral foi capaz de reduzir a progressão do tumor visto que MMP-9 foi diminuída através da inibição do TGF- β R1 (Moore-Smith et al, 2017). Juntos, estes dados sugerem que pode estar ocorrendo algum feedback positivo entre MMP-9 e TGF- β R1 em FG, embora, o mecanismo envolvendo este feedback ainda não tenha sido elucidado, sendo assim, garantirá fomento para novos estudos.

TGF- β é um fator de crescimento que pode inibir e ao mesmo tempo estimular a proliferação celular, pode regular o sistema imune agindo como um mediador pró-inflamatório, e pode coordenar a síntese de componentes de ECM através da produção de proteínas de matriz, como o colágeno, e de enzimas proteolíticas (Munger and Sheppard, 2011). Neste estudo, fizemos uso de um inibidor de TGF- β , o composto SB431542. Trata-se de um composto imidazol responsável pela alteração estrutural (através da substituição de anéis fenil em

posições conhecidas) de receptores ALK5, impedindo sua fosforilação, e em consequência, a fosforilação das Smad2/3 principalmente. O SB431542 não atua nas vias não-canônicas do TGF- β (Laping et al, 2002).

Liu et al., correlacionou níveis diminuídos de IL-10 e IL-6 com uma grande quantidade de TGF- β em camundongos nocaute para Smad3, um importante fator para a sinalização do TGF- β e da produção de colágeno (Liu et al, 2017). Este dado enfatiza que o fator de crescimento em questão tem um papel importante como mediador do processo inflamatório. Em nosso estudo, nós mostramos que TGF- β 1 está aumentado em modelos *in vitro* de fibroblastos gengivais de animais com DP-ind. Esse resultado está de acordo com estudos que analisaram cultura de fibroblastos de pacientes humanos com DP (Ohshima et al., 2010; Mize et al., 2015). Ohshima et al., também observou que a DP levou a uma inibição da expressão gênica de colágenos apesar do aumento na produção de TGF- β 1 (Ohshima et al, 2010). Entretanto, Tipton e Dabbous já haviam descrito que a superexpressão de TGF- β leva á crescimento gengival anormal e fibrose (Tipton e Dabbous, 1998); e, em nosso estudo, um aumento da expressão e produção de TGF- β 1 está correlacionado com a inibição da expressão gênica de colágeno tipo 1, e um aumento da expressão e produção de MMP-9. A relação entre TGF- β e MMP-9 foi descrita por Serralheiro et al, que demonstrou uma expressão aumentada de MMP-9 quando fibroblastos de veias safena foram estimulados com TGF- β 1 (Serralheiro et al, 2017), o que corrobora nosso estudo, porém as vias envolvidas neste processo ainda não estão elucidadas. Eles também hipotetizaram que o TGF- β possui um papel dual, qual seja estimulando a expressão de colágeno, ou estimulando a expressão e produção de proteinases de matriz, que podem ser explicados a depender das diferentes fases da doença.

Alguns pesquisadores têm sugerido que este sinergismo acontece através da ativação da Smad3 pelos receptores de TGF- β , pelas vias de sinalização da ERK, p38 MAPK, e pela via da miosina quinase de cadeia leve (MLCK, sigla em inglês), em estudos com cultura de linhagem de células de câncer e de células endoteliais (Takahashi et al., 2015; Kim et al., 2004; Sinpitaksakul et al., 2008). Tendo isto sido descrito, podemos presumir que existe correlação entre MMP-9 e TGF- β , uma vez que cada inibidor foi capaz de produzir efeito inibitório de um para outro, e também que o inibidor de MMP-9 diminuiu a expressão de TGF- β R1. Autores têm demonstrado possíveis vias envolvidas na correlação entre TGF- β e colágeno, mostrando que a proteína Smad3 leva a uma produção de colágeno induzida pelo TGF- β (Chen et al, 2014), e isso foi inibido em nosso estudo pelo composto SB431542, um inibidor de receptor ALK5. Além disso, MMP-9 regula a expressão e atividade do TGF- β , clivando TGF- β latente de maneira coordenada, de forma a aumentar a progressão tumoral e a angiogênese como Yu e Stamenkovic descreveram (Yu e Stamenkovic, 2000). Assim é possível especular que o receptor ALK5, um TGF- β R1, pode estar envolvido na modulação da expressão de MMP-9, TGF- β 1 e colágeno em FG de camundongos normais e diabéticos com DP.

Dexametasona é um glicocorticóide. Ele tem efeitos anti-inflamatórios, inibindo a expressão e produção de mediadores como citocinas, quimiocinas, TGF- β e outros. Seu aspecto anti-inflamatório tem sido bem definido através do bloqueio de receptores glicocorticóides, que é considerado um fator regulador, capaz de modular muitos genes transcricionais, relacionados ao processo inflamatório, suprimindo a resposta imune. A dexametasona é uma substância lipofílica, que se liga a receptores citosólicos no interior das células (receptores

glicocorticoides). Este complexo adentra o núcleo celular e altera diretamente a transcrição gênica, principalmente dos genes para fator nuclear κ B (NF κ B, sigla em inglês). O NF κ B um importante sinalizador citoplasmático que após a ativação, influencia positiva ou negativamente, a transcrição gênica da maioria das citocinas inflamatórias e outras estruturas que participam do processo inflamatório (Laur et al, 1988; Coutinho e Chapman, 2011; Barnes, 1998; Munck e Guyre, 1986).

No presente estudo, encontramos que dexta drasticamente reduziu a expressão e produção de MMP-9, colágeno, TGF- β e TGF- β R1. Adicionalmente a isto, outros estudos mostraram que a dexta teve impacto negativo na produção de colágeno após estimulação com TGF- β em fibroblastos de granuloma de ratos (Meisler et al, 1997). Slavin et al., havia descrito que a dexametasona estaria influenciando nas funções do fibroblasto uma vez que as TIMPs também se diminuiriam quando o glicocorticóide fosse usado, o que aumentaria a atividade das MMPs no local da injúria (Slavin et al, 1994). Por outro lado, Weiner et al., descreveu que durante a fibrose hepática, dexta teve efeito negativo na expressão de colágeno através de um efeito direto no gene promotor e provavelmente no conteúdo pós transcricional de pró-colágeno a nível de mRNA (Weiner et al, 1987). De acordo com Liu et al., dexta teve um efeito inibitório na produção de MMP-9 ao inibir citocinas que possivelmente estimulariam a expressão de MMP-9 (Liu et al, 2008). Congruente com este resultado está Namba et al., que descreveu a mesma inibição de MMP-9 usando dexta em fibroblastos sinoviais (Namba et al, 2006). Dexta foi também capaz de diminuir a expressão e produção de TGF- β , e isto pode estar relacionado com a inibição das vias ERK e Akt, propostas por Han et al., 2016. Sendo assim, é possível sugerir que a dexta pode

agir inibindo citocinas e/ou bloqueando o gene promotor da MMP-9 e do TGF- β . Porém, o mecanismo exato envolvido não está completamente claro ainda.

Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que a inibição de TGF- β R1 via ALK5 levou a diminuição da expressão do colágeno, e da expressão e produção de MMP-9 e TGF- β , em fibroblastos gengivais em condições normoglicêmicas e hiperglicêmicas, após a doença periodontal.

Conclusão

A inibição de TGF- β R1 via ALK5 levou a diminuição da expressão do colágeno, e da expressão e produção de MMP-9 e TGF- β , em fibroblastos gengivais em condições normoglicêmicas e hiperglicêmicas, após a doença periodontal.

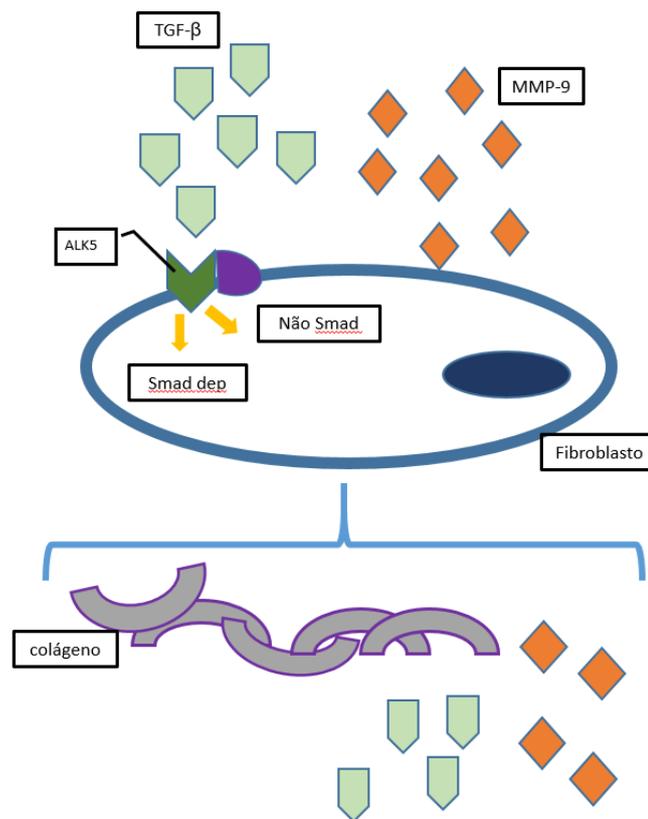


Figura 11. Esquema gráfico dos achados deste estudo. Nela observa-se um fibroblasto com um receptor do tipo ALK5 (um receptor de TGF- β do tipo 1) formando um dímero com um receptor do tipo 2, sendo fosforilado e dando início aos dois tipos de vias de sinalização, uma dependente de proteínas Smad, e outra não-dependente. A ilustração mostra que este receptor pode ser sensibilizado pelo TGF- β , porém, de alguma forma, a presença de MMP-9 no meio extracelular contribui para a sensibilização deste receptor. Após a ativação destas vias de sinalização, a figura representa no canto inferior, os produtos resultantes desta ativação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbass MM, Korany NS, Salama AH, Dmytryk JJ, Safiejko-Mroczka B. The relationship between receptor for advanced glycation end products expression and the severity of periodontal disease in the gingiva of diabetic and non diabetic periodontitis patients. *Archives of Oral Biology* 2012; 57(10):1342–1354.

Abel M, Vliagoftis H. Mast Cell-Fibroblast Interactions Induce Matrix Metalloproteinase-9 Release from Fibroblasts: Role for IgE-Mediated Mast Cell Activation. *The Journal of Immunology* 2008; 180:5 3543–3550.

Almeida T, Valverde T, Martins-Júnior P, Ribeiro H, Kitten G, Carvalhaes L. Morphological and quantitative study of collagen fibers in healthy and diseased human gingival tissues. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2015; 56(1), 33–40.

Álvares PR, Arruda JAA, Silva LP, Nascimento GJF, Silveira MMF, Sobral APV. Immunohistochemical expression of TGF- β 1 and MMP-9 in periapical lesions. *Braz. Oral Res* 2017; 31:51 1-8.

American Diabetes Association. Classification and diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 2018; 41(Suppl. 1):S13–S27.

American Diabetes Association. Improving care and promoting health in populations: Standards of medical care in Diabetes. *Diabetes Care* 2018;41(Suppl.1):S7–S12.

Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 1998; 94(6):557-72.

Bastos MF, Tucci MA, De Siqueira A, et al. Diabetes may affect the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors more than smoking in chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research* 2017; 52(2):292–299.

Birkedal-Hansen H. Role of Matrix Metalloproteinases in Human Periodontal Diseases. *J Periodontol* 1993; 64(5).

Buduneli N, Atilla G, Güner G, Oktay G. Biochemical analysis of total collagen content and collagen types I, III, IV and VI in gingiva of various periodontitis categories. *Journal of the International Academy of Periodontology* 2001; (3)1:6.

Casanova L, Hughes FJ, Preshaw PM. Diabetes and periodontal disease: a two-way relationship. *British Dental Journal* 2014, 217:433-437.

Chang P-C, Chien L-Y, Chong LY, Kuo Y-P, Hsiao J-K. Glycated matrix upregulates inflammatory signaling similarly to porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. *J Periodont Res* 2013; 48:184–193.

Chen WJ, Dijke P. Immunoregulation by members of the TGF- β superfamily. *Nature Reviews – Immunology* 2016; 16:722-740.

Chen X, Wang H, Liao HJ, et al. Integrin-mediated type II TGF-beta receptor tyrosine dephosphorylation controls SMAD-dependent profibrotic signaling. *J Clin Invest* 2014; 124:8 3295-310.

Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-b). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1998; 30:293-298

Coutinho AE, Chapman KE. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2011; 335(1):2-13.

De Molon RS, Ibiapina VM, Avila ED, et al. Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. *Clin Oral Invest* 2016; 20 1203–1216.

Elenkova M, Tipton DA, Karydis A, Stein SH. Vitamin D attenuates human gingival fibroblast inflammatory cytokine production following advanced glycation end product interaction with receptors for AGE. *J Periodontal Research* 2019; 54:154–163.

Fitzsimmons TR, Ge S, Bartold PM. Compromised inflammatory cytokine response to *P. gingivalis* LPS by fibroblasts from inflamed human gingiva. *Clin Oral Invest* 2018; 22: 919.

Flavell SJ, Hou TZ, Lax S, Filer AD, Salmon M, Buckley CD. Fibroblasts as novel therapeutic targets in chronic inflammation. *British journal of pharmacology* 2008;153 Suppl 1:S241-6.

Franco C, Patricia HR, Timo S, Claudia B, Marcela H. Matrix metalloproteinases as regulators of periodontal inflammation. *International Journal of Molecular Sciences* 2017; 18(2):1–12.

Golub LM, Gregg AN, Vincent JI, Nungavaram S. In vivo crevicular leukocyte response to a chemotactic challenge: inhibition by experimental diabetes. *Infection and immunity* 1982; 37:03 1013-20.

Han S, Bui NT, Ho MT, Kim YM, Cho M, Shin DB. Dexamethasone inhibits TGF- β 1-induced cell migration by regulating the ERK and AKT pathways in human colon cancer cells via CYR61. *Cancer Research and Treatment* 2016; 48(3):1141–1153.

Heldin CH, Moustakas A. Signaling Receptors for TGF- β Family Members. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016; 1;8(8).

Hsieh H-L, Wang H-H, Wu W-B, Chu P-J, Yang C-M. Transforming growth factor- β 1 induces matrix metalloproteinase-9 and cell migration in astrocytes: roles of ROS-dependent ERK- and JNK /NF- κ B pathways. *Journal of Neuroinflammation* 2010; 7(88).

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 8^a Edition. 2017.

Javaid M, Bi J, Biddle C, Tsai CM, Häkkinen L, Kim H. Platelet factor 4 upregulates matrix metalloproteinase-1 production in gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research* 2017; 52:4 787–792.

Jiang SY, Wei CC, Shang TT, Lian Q, Wu CX, Deng JY. High glucose induces inflammatory cytokine through protein kinase C-induced toll-like receptor 2 pathway in gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 427: 666–670.

Kim ES, Kim MS, Moon A. TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. *International Journal of Oncology* 2004; 25(5):1375–1382.

Kim KA, Chung SB, Hawng EY, et al. Correlation of expression and activity of matrix metalloproteinase-9 and -2 in human gingival cells of periodontitis patients. *Journal of Periodontal and Implant Science* 2013; 43(1):24–29.

Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nature Reviews* 2017; 3:1-14.

Kumar MS, Vamsi G, Sripriya R, Sehgal PK. Expression of Matrix Metalloproteinases (MMP-8 and -9) in Chronic Periodontitis Patients With and Without Diabetes Mellitus. *Journal of Periodontology* 2006; 77(11):1803–1808.

Lalla E and Papapanou PN. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two commom interrelated diseases. *Nature reviews- Endocrinology* 2011; 7: 738–748.

Laping NJ, Grygielko E, Mathur A et al. Inhibition of Transforming Growth Factor- β (TGF- β) 1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF- β type I receptor kinase activity: SB-431542. *Molecular Pharmacology* 2002; 62(1):58-64.

Laue L, Loriaux DL, Chrousos GP. Glucocorticoid antagonists and the role of glucocorticoids at the resting and stress state. *Adv Exp Med* 1988; 245:225-35.

Laur L, Kawai S, Brandon DD et al. Receptor-mediated effects of glucocorticoids on inflammation: Enhance of the inflammatory response with a glucocorticoid antagonist. *Journal of Steroid Biochemical* 1988; 29(6):591-598.

Lazăr L, Loghin A, Bud ES, Cerghizan D, Horváth E, Nagy EE. Cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 expressions correlate with tissue inflammation degree in periodontal disease. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2015; 56(4):1441–1446.

Levin JI, Chen J, Hogan DM, Kincaid S et al. The discovery of acid-based MMP inhibitors. Part 2: SAR of the 5-position and P1 groups. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2001; (11)2189-2192.

Li WL, Wu CH, Yang J, et al. Local Inflammation Alters MMP-2 and MMP-9 Gelatinase Expression Associated with the Severity of Nifedipine-Induced Gingival Overgrowth: a Rat Model Study. *Inflammation* 2015; 38(4):1517–1528.

Lifshitz V, Frenkel D. TGF- β . In: Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition). *Academic Press* 2013. P. 1647-1653.

Liu K, Gao Z, Zhou G, Zhang W, Wu X, Liu W. Characterization of Smad3 knockout mouse derived skin cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal* 2017; 53(5):458–466.

Liu X, Han Q, Sun R, Li Z. Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinase expression in experimental pneumococcal meningitis. *Brain Research* 2008; 1207:237–243.

Livak and Schmittgen. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 2008; 3(6).

Llambés F, Arias-Herrera S, Caffesse R. Relationship between diabetes and periodontal infection. *World Journal of Diabetes* 2015; 6:7 927–935.

Martins MD et al. Epigenetic Modifications of histones in Periodontal Disease. *Journal of Dental Research* 2015; 1:8

Meisler N, Keefer KA, Ehrlich HP, Yager DR, Myers-Parrelli J, Cutroneo KR. Dexamethasone abrogates the fibrogenic effect of transforming growth factor- β in rat granuloma and granulation tissue fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* 1997; 108(3):285–289.

Mize TW, Sundararaj KP, Leite RS, Huang Y. Increased and correlated expression of connective tissue growth factor and transforming growth factor beta 1 in surgically removed periodontal tissues with chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research* 2015; 50(3):315–319.

Moore-Smith LD, Isayeva T, Lee JH, Frost A, Ponnazhagan S. Silencing of TGF- β 1 in tumor cells impacts MMP-9 in tumor microenvironment. *Scientific Reports* 2017; 7(1):1–10.

Munck A and Guyre PM. Glucocorticoid physiology, pharmacology and stress. *Adv Exp Med Biol* 1986; 196:81-96.

Munger JS, Sheppard D. Cross Talk among TGF- β Signaling Pathways, Integrins, and the Extracellular Matrix. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3:a005017.

Namba Y, Tanaka H, Fujii K, Matsuda T, Asano K, Hisamitsu T. Influence of Dexamethasone on Matrix Metalloproteinase Production from Human Synovial Fibroblasts in vitro. *The Showa University Journal of Medical Sciences* 2006; 18(2):93–101.

Navnita S, Savita S, Rithesh K, Shivaprasad BM. Evaluation of collagen degradation in gingival epithelium and connective tissue of chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *Int J Scien Res* 2017; 6:6 33-35.

Ohshima M, Yamaguchi Y, Matsumoto N, et al. TGF- β Signaling in Gingival Fibroblast-Epithelial Interaction. *Journal of Dental Research* 2010, 89:11 1315–1320.

Palm E, Demirel I, Bengtsson T, Khalaf H. The role of toll-like and protease-activated receptors and associated intracellular signaling in Porphyromonas gingivalis-infected gingival fibroblasts. *APMIS* 2017.

Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews – Immunology* 2004; (4)617–629.

Popescu MR, Surlin P, Rauten AM, Dragomir L, Olteanu M. Histological analysis of collagen fibers in patients with diabetes mellitus and periodontal disease. *J Cytol Histol* 2014; S04:008.

Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia* 2012; 55:21-31.

Ren L, Fu Y, Deng Y, Qi L, Jin L. Advanced Glycation End Products Inhibit the Expression of Collagens Type I and III by Human Gingival Fibroblasts. *Journal of Periodontology* 2009; 80(7): 1166–1173.

Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ Transport and Cytotoxicity: Specific Enhancement in GLUT2-Expressing Cells. *Diabetes* 1994; 93:11 1326–1333.

Sempowski GD, Chess PR, Moretti AJ, et al. CD40 Mediated Activation of Gingival and Periodontal Ligament Fibroblasts. *J Periodontol* 1997; 68:3 284–292.

Serralheiro P, Cairrão E, Maia CJ, João M, Almeida CMC, Verde I. Effect of TGF- β 1 on MMP/TIMP and TGF-beta1 receptors in great saphenous veins and its significance on chronic venous insufficiency. *Phlebology* 2017; 32(5):334–341.

Sinpitaksakul SN, Pimkhaokham A, Sanchavanakit N, Pavasant P. TGF- β 1 induced MMP-9 expression in HNSCC cell lines via Smad/MLCK pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 371(4):713–718.

Slavin J, Unemori E, Hunt TK, Amento E. Transforming growth factor beta (TGF- β) and dexamethasone have direct opposing effects on collagen metabolism in low passage human dermal fibroblasts in vitro. *Growth Factors* 1994; 11(3):205-213.

Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 1988; 67(1):66-70.

Sonnenschein SK and Meyle J. Local inflammatory reactions in patients with diabetes and periodontitis. *Periodontology 2000* 2015; 69:1 221–254.

Suckow MA., Danneman P, Brayton C. *The laboratory mouse*. New York, NY, USA: CRC Press,2000:18.

Surlin P, Oprea B, Solomon SM, et al. Matrix metalloproteinase -7, -8, -9 and -13 in gingival tissue of patients with type 1 diabetes and periodontitis. *Rom J Morphol Embryol* 2014, 55(3 Suppl):1137–1141.

Takahashi Y, Maki T, Liang AC, Itoh K, Lok J, Osumi N, Arai K. p38 MAP kinase mediates transforming-growth factor- β 1-induced upregulation of matrix metalloproteinase-9 but not -2 in human brain pericytes. *Brain Res* 2015; 17:1-8.

Tipton DA, Dabbous MK. Autocrine Transforming Growth Factor beta Stimulation of Extracellular Matrix Production by Fibroblasts from Fibrotic Human Gingiva. *Journal of Periodontology* 1998; 69(6):609–619.

Tipton DA, Hatten AA, Babu JP, Dabbous MK. Effect of glycated albumin and cranberry components on interleukin-6 and matrix metalloproteinase-3 production by human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research* 2015; 51:2 228–236.

Vondooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2013, 1:51.

Weiner FR, Czaja MJ, Jefferson DM, et al. The effects of dexamethasone on in vitro collagen gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 1987; 262(15):6955–6958.

Wu L, Derynck R. Essential role of TGF- β signaling in glucose-induced cell hypertrophy. *Dev Cell* 2009; 17:1 35–48.

Wu M, Crane JS. Biochemistry, Collagen Synthesis. [Atualizado em 21 de Abril de 2019]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatePearls Publishing; 2019 Jan. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507709/>.

Yakovlev E, Kalichman I, Pisanti S, Shoshan S, Barak V. Levels of Cytokines and Collagen Type I and Type III as a Function of Age in Human Gingivitis. *J Periodontol* 1996; 67:8 788-93.

Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & Development* 2000; 14:163–176.

Yu S, Li H, Ma Y, Fu Y. Matrix metalloproteinase-1 of gingival fibroblasts influenced by advanced glycation end products (AGEs) and their association with receptor for AGEs and nuclear factor-kappa B in gingival connective tissue. *J Periodontol* 2012; 83: 119–126.

Zheng J, Chen S, Albiero ML, et al. Diabetes Activates Periodontal Ligament Fibroblasts via NF- κ B In Vivo. *Journal of Dental Research* 2018; 97(5):580–588.

Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor- β . *J Clin Invest* 1994; 93:536–542.