



Universidade Federal de Juiz de Fora
Mestrado em Saúde Brasileira
Núcleo Interdisciplinar de Estudos e Pesquisas
em Nefrologia - NIEPEN

SIMONE APARECIDA PROBST CONDÉ

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ROXITROMICINA NA REGRESSÃO DA
HIPERPLASIA GENGIVAL INDUZIDA PELA CICLOSPORINA EM
RATOS**

Juiz de Fora
2007

SIMONE APARECIDA PROBST CONDÉ

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ROXITROMICINA NA
REGRESSÃO DA HIPERPLASIA GENGIVAL INDUZIDA
PELA CICLOSPORINA EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Saúde Brasileira pela Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Nefrologia

**Orientadores: Marcus Gomes Bastos
Fernando Monteiro Aarestrup**

**Juiz de Fora
2007**

Condé, Simone Aparecida Probst

Avaliação do Efeito da Roxitromicina na Regressão da Hiperplasia Gengival Induzida pela Ciclosporina em Ratos / Simone Aparecida Probst Conde. Juiz de Fora, 2007
125 f.

Dissertação de Mestrado (Saúde Brasileira - Programa de Pós-Graduação Saúde Brasileira) -Universidade Federal de Juiz de Fora

Orientador: Marcus Gomes Bastos
Bibliografia: f.

1. HIPERPLASIA GENGIVAL. 2. ROXITROMICINA.
3. TGF- β_2 . I. Universidade Federal Fluminense. II.Título.

SIMONE APARECIDA PROBST CONDÉ

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ROXITROMICINA NA REGRESSÃO DA
HIPERPLASIA GENGIVAL INDUZIDA PELA CICLOSPORINA EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Saúde Brasileira pela Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Nefrologia

ORIENTADORES

Prof. Dr. Marcus Gomes Bastos

Departamento de Clínica Médica / Universidade Federal de Juiz de Fora - MG

Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup,

Centro de Biologia da Reprodução, Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental

Universidade Federal de Juiz de Fora - MG

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Neuza Maria Souza Picorelli Assis

Universidade Federal de Juiz de Fora - MG

Prof^a. Dr^a. Aparecida Alves do Nascimento

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - RJ

Prof. Dr. Marcus Gomes Bastos

Universidade Federal de Juiz de Fora - MG

Juiz de Fora, ____ de _____ de 2007

*Ao meu marido Sérgio, pelo apoio,
compreensão e amor. À minha mãe
pela luz que nos irradia.*

AGRADECIMENTOS

Às duas pessoas mais importantes para a minha caminhada profissional: aos mestres Fernando Monteiro Aarestrup e Marcus Gomes Bastos, por sempre acreditarem em mim, e, principalmente, me fizeram despertar para a pesquisa com entusiasmo e dedicação. Toda minha gratidão e respeito.

Aos meus pais queridos que contribuíram para minha formação como pessoa, me mostraram o quê é essencial na vida e serão sempre meu norte.

Ao meu amor Sérgio, pelo companheirismo e, principalmente, pela felicidade de tê-lo ao meu lado sempre.

Aos amigos, em especial, à Beatriz e à Luciana pela amizade, disposição e toda ajuda indispensável para realização desse trabalho, assim como a de Ivo durante o modelo experimental.

Aos familiares, principalmente, aos irmãos que tanto me incentivaram e compreenderam a ausência.

Enfim, a todos que torceram por mim e que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão dessa dissertação.

SUMÁRIO

1. Introdução	12
1.1. Hiperlasia Gengival nos Pacientes Transplantados Renais	12
1.2. Histofisiologia do Periodonto	15
1.3. Características Clínicas e Histológicas da HG	19
1.4. Fatores Predisponentes	26
1.5. Patogênese da HG	34
1.6. Tratamento da HG	42
2. Objetivos	47
3. Material e Métodos	48
3.1. Animais de Experimento	48
3.2. Experimento: Avaliação do Efeito Terapêutico da Roxitromicina na HG.....	49
3.3. Análise Macroscópica da HG.....	51
3.4. Análise Histopatológica da HG	54
3.5. Estudo Imuno-histoquímico	57
3.6. Análise Estatística	59
4. Resultados.....	60
4.1. Artigo 1	61
4.2. Artigo 2	81
4.3. Artigo 3	94
5. Comentários Finais.....	116
6. Referências Bibliográficas.....	117

ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTO: Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
AMP: ampicilina
AZI: azitromicina
Bcl-2: oncogene
CBR: Centro de Biologia da Reprodução
COX-2: ciclooxigenase 2
CsA: ciclosporina
CTGF: fator de crescimento de tecido conjuntivo
FGF-2: fator de crescimento de fibroblastos 2
HE: hematoxilina e eosina
HG: hiperplasia gengival
HLA-A: antígeno do MHC classe I - A
HLA-B: antígeno do MHC classe I - B
HLA-C: antígeno do MHC classe I - C
HLA-DR1: antígeno do MHC classe II – DR1
HLA-DR2: antígeno do MHC classe II – DR2
IL-1: interleucina 1
IL-1B: interleucina 1B
IL-6: interleucina 6
LPS: lipopolissacarídeos
MAP quinase: proteína quinase ativada por mitógeno
MMG: morfometria da mucosa gengival
MMP: metaloproteinase
MMP-13: metaloproteinase 13
mRNA: RNA mensageiro
ng/ml: nanogramas por mililitro
NF-Kb: fator nuclear Kappa B
NIF: nifedipina
OP-17: metabólito da ciclosporina
PAB: diaminobenzina
PAP: complexo peroxidase anti-peroxidase
PBS: tampão fosfato
PCR: técnica de reação em cadeia da polimerase
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGF-B: fator de crescimento derivado de plaquetas B
ROX: roxitromicina
TGF β_1 : fator de crescimento transformador β_1
TGF β_2 : fator de crescimento transformador β_2
TGF β_3 : fator de crescimento transformador β_3
TNF- α : fator de necrose tumoral α
UFJF: Universidade Federal de Juiz de Fora

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Aspecto geral do periodonto

Figura 02 – Aspecto clínico de paciente transplantada renal que faz uso de ciclosporina

Figura 03 – Aspecto clínico de paciente transplantado cardíaco que faz uso de ciclosporina e amlodipina

Fig. 04 – Esquema terapêutico dos animais dividido em semanas

Figura 05 – Moldagem em silicona de condensação para obtenção de modelo de gesso para análise morfométrica da região maxilar anterior superior dos ratos

Fig. 06 – Morfometria da mucosa gengival anterior (MMG), utilizando um paquímetro digital

Fig. 07 – Histomorfometria. Demonstração de contagem de células inflamatórias (aumento 400x).

Fig. 08 – Histomorfometria. Demonstração de marcação do epitélio e tecido conjuntivo de animal do grupo 1/ controle negativo - mucosa gengival (aumento 100x).

CONDÉ, S.A.P. **Avaliação da Roxitromicina na regressão da hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina em ratos.** Juiz de Fora (MG), 2007. 125 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora

RESUMO

A hiperplasia gengival (HG) é um efeito colateral comum do uso crônico da ciclosporina (CsA), imunossupressor amplamente usado em pacientes transplantados para evitar a rejeição de órgãos. Estudos recentes demonstraram níveis elevados de citocinas específicas no tecido gengival hiperplasiado, principalmente o TGF- β , sugerindo que esse fator de crescimento tenha um papel no acúmulo da matriz extracelular visto na hiperplasia gengival. O tratamento para essa complicação, até pouco tempo, era somente cirúrgico. Hoje vários estudos demonstraram a eficácia da azitromicina, antibiótico macrolídeo, na regressão desse efeito colateral indesejado causado pelo imunossupressor. No presente estudo, foi realizado um modelo experimental para avaliação do efeito terapêutico da roxitromicina na HG. Foram utilizados 32 ratos divididos em quatro grupos, com indução da HG em cinco semanas e tratamento com a droga na 6ª semana (grupo A – animais que receberam salina; grupo B – animais que receberam CsA e foram tratados com salina na 6ª semana; grupo C – animais que receberam CsA e, na 6ª semana, ampicilina e grupo D – animais que receberam CsA durante 5 semanas e, na seguinte, foram tratados com roxitromicina). Portanto, neste estudo foi avaliado o efeito da roxitromicina no tratamento da HG. Adicionalmente, a expressão do fator de crescimento transformador beta (TGF- β_2) foi investigado, através da técnica de imunohistoquímica, pelo método do complexo avidina-biotina peroxidase anti-peroxidase, com a finalidade de melhor compreender a patogênese da HG. Os resultados demonstraram que a roxitromicina foi efetiva na regressão da hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina em ratos. Houve redução significativa da mucosa gengival, com redução do número de fibroblastos, das áreas de fibrose e de infiltrado inflamatório, assim como da expressão do TGF- β_2 em ratos tratados com a roxitromicina quando comparados com os grupos controles. Portanto, os dados sugerem que a diminuição da expressão do TGF- β_2 pode ser um importante mecanismo de ação pelo qual a roxitromicina inibe a HG.

Palavras-chave: hiperplasia gengival, ciclosporina, roxitromicina, TGF- β_2

CONDÉ, S.A.P. **Evaluation of roxithromycin effects in the reduction cyclosporin-induced gingival overgrowth in rats.** Juiz de Fora (MG), 2007. 125 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora

ABSTRACT

Gingival overgrowth (GO) is a common side effect of the chronic use of cyclosporine (CsA), an immunosuppressive drug which is widely used to prevent organ rejection in transplant patients. Recent studies have shown elevated levels of specific cytokines in hyperplastic gingival tissue, particularly TGF- β , which suggests that this growth factor plays a role in the accumulation of extracellular matrix in gingival hyperplasia. Treatment for this complication, until recently, was only surgical. Today, several studies have demonstrated the effectiveness of azithromycin, a macrolide antibiotic, in the regression of this undesirable side effect caused by the immunosuppressant. In this study, an experimental model for assessing the therapeutic effect of roxithromycin in GO was created. We used four groups of mice totaling 32 individuals. GO was induced during five weeks and drug treatment was given on the 6th week as follows: group A – animals received saline; group B – animals received CsA and were treated with saline on the 6th week; group C – animals received CsA and, on the 6th week, ampicilin; and group D – animals received CsA during 5 weeks and, on the 6th week, were treated with roxithromycin. Therefore, this study evaluated the effect of roxithromycin in the treatment of GH. Additionally, we investigated the expression of transforming growing factor beta (TGF- β_2) through an immunohistochemical technique (avidin-biotin-peroxidase-antiperoxidase complex) in order to better understand the pathogenesis of GO. Gingival mucosa showed a decrease of thickness with a lower number of fibroblasts, with reduction of fibrosis areas and decrease of inflammatory infiltrate, and a significant reduction of TGF- β_2 expression in roxithromycin treated rats in comparison with animals from the control groups. The present data suggest that the down-regulation of TGF- β_2 expression may be an important mechanism of action by which roxithromycin inhibits GO.

Key-words: gingival overgrowth, cyclosporine, roxithromycin, TGF- β_2

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Hiperplasia gengival em pacientes transplantados renais

A hiperplasia gengival (HG) é uma condição patológica comum em pacientes transplantados que fazem uso crônico de medicação imunossupressora, especificamente a ciclosporina, provocando outros efeitos colaterais, tais como, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, hipertensão, hipertricose, entre outros (RATEITSCHAK-PLUSS et al., 1983; KAHAN, 1989).

A ciclosporina (CsA) é produzida a partir do fungo *Tolypocladium inflatum gams*, sendo um polipeptídeo cíclico neutro, hidrofóbico, composto por onze aminoácidos. Atua, especificamente, na supressão da resposta imune mediada por células. É uma droga imunossupressora largamente usada para prevenir a rejeição

de órgãos transplantados (YOSHIDA, NAGATA, YAMANE, 2005), além de utilizada no tratamento de diversas doenças auto-imunes, tais como diabetes mellitus, doença de Behcet, psoríase, esclerose múltipla, líquen plano erosivo, lúpus eritematoso sistêmico (JAMES, IRWIN, LINDEN, 1996), pênfigo bolhoso, artrite reumatóide, miastenia gravis, uveítes e diversas glomerulopatias (KAHAN, 1989; DE MATTOS et al., 1996). A droga sofre biotransformação no fígado, resultando em 14 produtos metabólicos, sendo que 90% são excretados pelas fezes e 10% eliminados pelos rins (SEYMOUR, THOMASON, ELLIS, 1996).

O primeiro relato na literatura abordando a indução da HG pela CsA foi em 1983 (RATEITSCHAK-PLUSS et al., 1983). Estudos subseqüentes indicaram uma prevalência média de pacientes transplantados com essa complicação, em torno de 30%, com uma variação entre 10 a 85% (WYSOCKI et al., 1983; DALEY, WYSOCKI, DAY, 1986; SEYMOUR, SMITH, ROGERS, 1987; WONDIMU et al., 1993; ALLMAN et al., 1994). Quando associada a outros medicamentos, como os anti-hipertensivos bloqueadores de canais de cálcio, essa prevalência aumenta, assim como a severidade, potencializando o risco. Essas drogas são freqüentemente usadas para o controle da pressão arterial em transplantados renais (THOMASON, SEYMOUR, RICE, 1993; BÖKENKAMP et al., 1994; O'VALLE et al., 1995; MARGIOTTA et al., 1996, RAMALHO et al., 2003). Em um estudo que avaliou três medicamentos do grupo dos bloqueadores de canais de cálcio quanto ao risco de desenvolvimento da HG, a nifedipina induzia clinicamente mais que a amlodipina e o diltiazem (ELLIS, SEYMOUR, STEELE, 1999). TAVASSOLI et al. (1998) observaram a presença de HG em 29% dos pacientes que

faziam uso de nifedipina (NIF), em graus variados. O'VALLE et al. (1995) demonstraram uma diferença nos achados morfométricos em pacientes controle, tratados somente com ciclosporina e tratados com a combinação de CsA e NIF, sendo esse último mais acentuado. MARGIOTTA et al. (1996) encontraram uma prevalência de 33,7% no grupo que foi administrado somente ciclosporina e 60% no grupo em que as drogas foram associadas, sugerindo um efeito sinérgico, pois ambas as drogas atuam na homeostase dos íons cálcio na célula, embora com mecanismos diferentes, reduzindo a atividade colagenolítica dos fibroblastos.

1.2 – Histofisiologia do periodonto

O conhecimento das características normais do periodonto é de grande importância para se comparar com os aspectos assumidos do mesmo na hiperplasia gengival induzida por ciclosporina. Uma vez estabelecidas as diferenças pode-se compreender melhor os mecanismos pelos quais a droga atua nos tecidos bucais.

O periodonto (peri = em torno de, odonto = dente) compreende os seguintes tecidos: gengiva, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar (Fig. 01). Esses elementos proporcionam a inserção e a estabilidade necessárias para que o dente desempenhe suas funções. A mucosa bucal é dividida em: mucosa mastigatória (gengiva, revestimento do palato duro), mucosa especializada (dorso da língua) e o restante chamado de mucosa de revestimento. A mucosa gengival recobre o colo anatômico dos dentes, o cemento supra-alveolar e uma porção do osso alveolar, limitada apicalmente pela linha muco-gengival e coronariamente pela crista gengival marginal (TEN CATE, MILLS, SOLOMON, 1971; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

A gengiva é dividida em livre (marginal e interdentária) e inserida. Apresenta coloração rósea, ausência de sangramento ou exsudação, consistência firme e resistência à sondagem no sulco gengival. Histologicamente, o tecido

gengival é revestido por epitélio escamoso estratificado, sendo que a mucosa inclui porções queratinizadas, correspondentes à porção bucal e não-queratinizadas, correspondentes ao epitélio do sulco e ao epitélio juncional (LINDHE & KARRING, 2005). Entre a gengiva livre marginal e a superfície dentária, existe um espaço virtual, em forma de “V”, formando o sulco gengival; sua profundidade normal é de um a dois milímetros nas superfícies vestibular e lingual ou palatina e de um a três milímetros nas superfícies interproximais. O epitélio de revestimento deste sulco é mais permeável do que as demais áreas da mucosa gengival, o que facilita as trocas de substâncias entre os meios interno e externo. A base do sulco gengival é formada pelo epitélio juncional, responsável pela união do tecido conjuntivo gengival ao dente e pela separação entre meio interno (periodontal) e externo (bucal). O número de células do epitélio juncional vai diminuindo à medida que se aproxima da junção amelo-cementária, formando, na porção mais profunda, a lâmina basal interna voltada para o dente e a lâmina basal externa voltada para o tecido conjuntivo (TEN CATE, MILLS, SOLOMON, 1971). O tecido conjuntivo gengival é denso e fibroso, dividido em camada papilar (subepitelial) e reticular (supraperióstea). É composto por fibras colágenas que sustentam o epitélio gengival e juncional, organizadas em feixes crestó-gengival, gengival-dentário, dento-periósteo, circular e transeptal.

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo frouxo, composto por fibras colágenas e matriz intercelular, altamente vascularizado e celular, apresentando vasos linfáticos e nervos. Circunda as raízes dos dentes e une o cimento ao osso alveolar. São divididos nos seguintes grupos: crestó-alveolar, horizontal, oblíquo e apical. As células do ligamento periodontal são: fibroblastos,

osteoblastos, osteoclastos, cementoblastos, macrófagos teciduais ocasionais, além de células epiteliais e nervosas (LINDHE & KARRING, 2005).

O cimento reveste a superfície radicular dos dentes, corresponde a um tecido calcificado especializado, sem inervação e vascularização. É constituído por uma porção orgânica composta por fibras colágenas e uma porção mineral, formada por cristas de hidroxiapatita. Insere as fibras do ligamento periodontal à raiz e contribui para o processo de reparo após danos à superfície radicular.

O osso alveolar é responsável pela sustentação dentária, diferindo do tecido ósseo de outras regiões, pois na ausência de dentes sofre reabsorção.

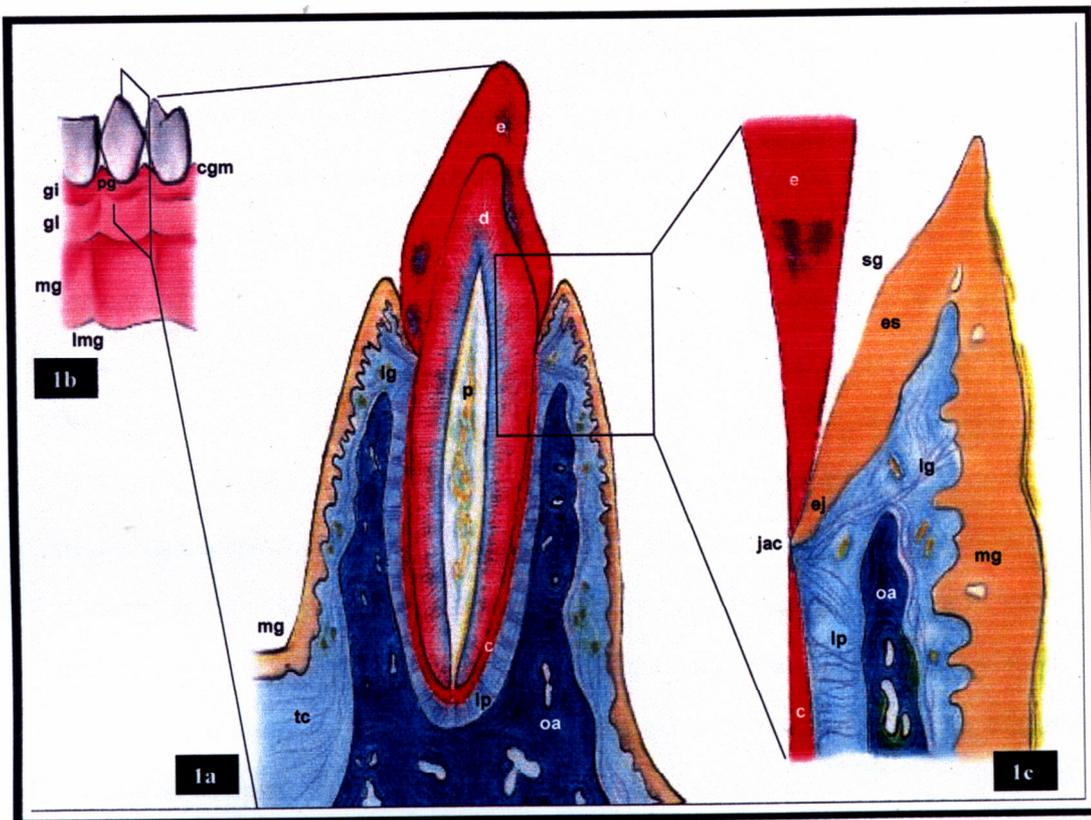


Fig. 01: Aspecto clínico e anatômico do periodonto. gl – gengiva livre; gi – gengiva inserida; mg – mucosa gengival; e – esmalte; d – dentina; p – polpa; lg – ligamento gengival; tc – tecido conjuntivo; lp – ligamento periodontal; oa – osso alveolar; c – cimento; jac – junção amelo-cementária; sg – sulco gengival; ej – epitélio juncional; es – epitélio do sulco gengival; cgm – crista gengival marginal.

1.3 – Características clínicas e histológicas da HG

O surgimento da hiperplasia gengival induzida por ciclosporina ocorre, em média, três meses após o início da administração do imunossupressor (SEYMOUR, JACOBS, 1992). Surge na papila interdentária, adquirindo uma aparência lobulada, aumentando de tamanho e se estendendo para a superfície dentária (NEWELL E IRWIN, 1997) (Figs. 02 e 03).



Fig. 02 – Paciente transplantado renal há 8 anos e 7 meses, fazendo uso de ciclosporina e apresentando HG severa.



Fig. 03 – Paciente transplantado cardíaco há 1 ano e 2 meses, fazendo uso de ciclosporina e amlodipina, apresentando HG moderada.

A avaliação do grau de HG, em humanos, mais utilizada, é determinada de acordo com o índice proposto por SEYMOUR, SMITH, TURNBULL (1985), medindo-se em modelo de gesso superior e inferior anterior à papila interdentária labial e palatal/lingual entre os caninos superiores e inferiores, avaliando o quanto a papila invadiu a superfície incisal dos dentes (“score” 0-3) e a espessura da papila labio-palatal/lingual (“score” 0-2). O índice máximo para cada papila é cinco e se todas as 20 papilas estiverem envolvidas o “score” é 100, representando uma HG severa, acometendo os tecidos gengivais labiais, palatais ou linguais superiores e inferiores dos dentes anteriores.

As características clínicas vão desde um tecido não inflamado, firme e fibroso até um tecido com aspecto hemorrágico, edematoso e inflamado, chegando a cobrir a superfície dentária (SPRATT et al., 1999).

A região mais acometida é a superior e anterior, sendo mais severa próxima aos caninos. Afeta toda a cavidade bucal, incluindo as faces labial, bucal, palatal, lingual (DALEY & WYSOCKI, 1984; THOMASON et al., 1996; GÓMEZ et al., 1997), porém é mais pronunciado na superfície labial da gengiva do que nas demais. (SEYMOUR, THOMASON, ELLIS, 1996). Não tem diferença significativa entre o grau de desenvolvimento da hiperplasia na maxila e na mandíbula (THOMASON, SEYMOUR, ELLIS, 1996). O crescimento gengival induzido pela ciclosporina afeta

quase que exclusivamente indivíduos dentados, porém, THOMAS, NEWCOMBE, OSBORNE (2000) encontraram esse efeito colateral em um paciente edêntulo, apesar de outros autores sugerirem que áreas com ausência de dentes não são acometidas pela hiperplasia gengival (WISOCKI et al., 1983; MORISAKI et al., 1993).

Estudos experimentais em ratos têm demonstrado que a largura buco-lingual, méso-distal e vertical da papila dentária encontra-se significativamente maior no grupo teste (tratado com CsA), quando comparados com o grupo controle (FU et al., 1995; CHEN et al., 2005). Resultados semelhantes foram encontrados nas dimensões gengivais das regiões maxilares e mandibulares de ratos expostos a CsA por duas, quatro e seis semanas. Foi observado também, nesse estudo, a alteração no posicionamento com a separação dos incisivos centrais nos ratos tratados com CsA, entretanto os ratos do grupo controle não apresentavam essas características. Eles sugerem que a presença de diastema deve ser resultado da expansão do tecido gengival hiperplasiado. Esta condição está presente em humanos, podendo apresentar o reposicionamento espontâneo dos dentes, após cirurgia periodontal em pacientes com HG severa induzida pela CsA. (FU et al., 1996).

A hiperplasia gengival induzida por diversos tipos de drogas, tais como as anteriormente citadas, é constituída, basicamente, por fibroplasia colágena associada a hiperplasia epitelial. Há presença de cristas epiteliais invadindo o tecido conjuntivo subepitelial, sendo esse último altamente vascularizado e com acúmulo

de infiltrado inflamatório. O infiltrado inflamatório é predominantemente mononuclear, representado por macrófagos, linfócitos e plasmócitos (BOLTCHI, REES, IACOPINO, 1999).

NIEH et al. (1996) utilizaram 60 ratos Sprague-Dawley divididos em grupo tratado (CsA) e grupo controle durante seis semanas e demonstraram alterações histopatológicas tanto na mucosa gengival quanto no osso alveolar. O tecido fibrovascular neoformado pôde ser observado na segunda semana de administração da droga na interface dente e gengiva do animal, aumentando progressivamente na quarta e sexta semanas. Foi observado neoformação vascular, presença de infiltrado inflamatório mononuclear difusamente distribuído. O alvéolo dentário revelou grande irregularidade, na superfície óssea, indicando um remodelamento ósseo ativo em animais tratados com CsA, também observada a partir da segunda semana. Portanto, os autores sugeriram que os tecidos do periodonto são o tecido alvo para a ação indutora da proliferação celular exercida por esse imunossupressor.

Segundo FU et al. (1995) que usaram, em seu experimento, dosagens diferentes de CsA em ratos (3 mg/kg/peso - baixa dose, 10 mg/kg/peso - dose clínica e 30 mg/kg/peso - alta dose), a mucosa gengival, microscopicamente, apresentou um tecido conjuntivo fibroso com intensa atividade angiogênica. Ocasionalmente, o epitélio gengival apresentou microulcerações. A parte mais profunda desse tecido fibrovascular neoformado invade em direção ao ligamento periodontal, além da presença de uma hiperplasia leve nos epitélios do sulco gengival e no epitélio da mucosa gengival. FU et al. (1996) encontraram, diferentemente do anterior, além da proliferação fibrovascular extensa, uma hiperplasia significativa do epitélio

pavimentoso estratificado da mucosa gengival no grupo tratado com ciclosporina.

Um estudo experimental em ratos jovens e adultos de indução da HG com o uso de CsA apresentou a espessura epitelial significativamente menor nos animais adultos, entretanto o tecido conjuntivo foi semelhante entre os grupos (SPOLIDORIO et al., 2003).

MORISAKI et al. (1997) encontraram em seus achados histológicos, um tecido gengival aumentado em ratos tratados com uma dose de 400µg/g/dieta de CsA, apresentando um epitélio hiperplásico, com acantose e acúmulo de componentes fibrosos intercelulares, diferentemente dos animais não-tratados do grupo controle. Relata a presença de leve infiltrado inflamatório, assim como o aumento do número de vasos sanguíneos em ambos os grupos. Resultados semelhantes obtidos por PAIK et al. (2004) que encontraram poucas células inflamatórias em seu modelo experimental em ratos tratados com ciclosporina.

Um tecido fibrovascular aumentado pode ser observado na quarta a sexta semanas de administração da ciclosporina, incluindo proliferação de vasos sanguíneos, infiltrado inflamatório difuso e extravasamento de hemácias no estroma edematoso (NIEH et al., 1996).

As características histopatológicas em humanos apresentam-se diversificadas, com neoformação vascular (RATEITSCHAK-PLÜSS et al., 1983), grau variável de aumento do número de fibroblastos e fibras colágenas (WYSOCKI

et al., 1983; TYLDESLEY, ROTTER, 1984), áreas focais de tecido conjuntivo de aspecto mixomatoso (ROSTOCK, FRY, TURNER, 1986) e infiltrado inflamatório crônico inespecífico (TRACKMAN & KANTARCI, 2004).

1.4 – Fatores predisponentes

Diversos trabalhos têm sugerido que a hiperplasia gengival induzida por drogas é de natureza multifatorial (SEYMOUR, THOMASON, ELLIS, 1996; THOMASON et al., 1996; NISHIKAWA, 1996), portanto idade, sexo, variáveis farmacocinéticas, predisposição genética, interação medicamentosa, níveis sanguíneos da droga, condições periodontais inadequadas, duração do tratamento e dose da droga são fatores que influenciam o desenvolvimento da HG, além de determinar quais indivíduos estão mais predispostos ao seu aparecimento (RAMALHO et al., 2003).

SEYMOUR, THOMASON, ELLIS (1996) sugerem que indivíduos jovens são mais susceptíveis à hiperplasia gengival do que adultos, pois as alterações do metabolismo andrógeno possam estar ligadas a essa predisposição. Isso pode ser observado num estudo de SOORYAMOORTHY, GOWER, ELEY (1990) que demonstram a existência de um fenótipo de fibroblastos típico de pacientes jovens ou devido a influência de hormônios sexuais. Foi encontrado um aumento da testosterona biologicamente ativa nesses pacientes. De acordo com DALEY, WYSOCKI, DAY (1986), indivíduos mais jovens são mais susceptíveis ao crescimento gengival induzido por drogas. Em outro estudo, essa prevalência foi de 48% em adultos e 30% em crianças (WILSON et al., 1998).

SPOLIDORIO et al. (2003) realizaram um modelo experimental utilizando 140 ratos Wistar de 15, 30, 60 e 90 dias de idade, administrando 10mg/kg CsA e 240 µg/g de nifedipina por via subcutânea e no grupo controle solução salina pela mesma via. Os resultados mostraram que os ratos mais jovens desenvolveram hiperplasia gengival mais acentuada, porém quando associados o imunossupressor e o bloqueador de canal de cálcio, os animais adultos apresentaram crescimento gengival, sugerindo, portanto, que a HG em ratos não depende da idade.

Em modelos experimentais, foi sugerido que machos são mais susceptíveis à hiperplasia gengival, devido, possivelmente, aos níveis de progesterona serem menores que os das fêmeas, pois esse hormônio causa um decréscimo na síntese de glicosaminoglicanas, que se encontra aumentada na HG (NISHIKAWA et al., 1996).

Em um estudo brasileiro com pacientes transplantados renais, foi constatado que não houve uma correlação entre o sexo (TORREZAN et al., 2005) e a idade (O`VALLE et al., 1995; THOMAS, NEWCOMBE, OSBORNE, 2000) com a hiperplasia gengival.

MARGIOTTA et al. (1996) utilizaram 113 pacientes transplantados renais, divididos em três grupos recebendo CsA, CsA e NIF e azatioprina (AZA) como grupo controle, demonstrando uma correlação entre a idade e o sexo. Os autores sugeriram que crianças e adolescentes apresentam um aumento do metabolismo

dos fibroblastos ou mudanças hormonais comuns nessa faixa etária que explicariam a frequência maior de HG entre eles. Entretanto, SPRATT et al. (1999) observaram uma proporção significativamente maior de homens do que mulheres apresentando a hiperplasia gengival induzida por CsA, estando também aumentada entre os jovens.

Sobre os fatores relacionados com a droga, estudos experimentais, utilizando ratos, demonstraram que o grau de hiperplasia gengival se mostrava mais acentuado à medida que se aumentavam as doses de ciclosporina, sugerindo um efeito dose-dependente em ratos (FU, NIEH, WIKESJÖ, 1997; FU et al., 1995). Um estudo, desenvolvido por MORISAKI et al. (1997), indicou que a severidade de hiperplasia gengival foi diretamente proporcional aos níveis sanguíneos e à dose diária da ciclosporina, pois o tratamento com essa droga teve uma incidência de 100% de HG em ratos. Porém, um outro estudo, utilizando cães da raça beagle, mostrou uma correlação da HG com os níveis sanguíneos, mas não com a dose do imunossupressor, sugerindo que os ratos são mais susceptíveis à hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina (SEIBEL et al., 1989).

Em humanos, THOMAS, NEWCOMBE, OSBORNE (2000) também demonstraram que existe uma ligação entre a dose e os níveis sanguíneos da CsA e a severidade da hiperplasia gengival, diferentemente de outros autores que não encontraram essa correlação (O´VALLE et al., 1995, SPRATT et al., 1999, MARGIOTTA et al., 1996, WILSON et al., 1998). Porém estes últimos sugeriram que os níveis sanguíneos do imunossupressor possam interferir na severidade da

doença. Adicionalmente, DALEY & WYSOCKI (1984) também demonstram que concentrações plasmáticas de ciclosporina acima de 155ng/ml são suficientes para induzir o crescimento gengival, enquanto outros indicam que não há influência dos níveis sanguíneos do imunossupressor (SEYMOUR, SMITH, ROGERS, 1987; PERNU et al., 1992; CEBECI et al., 1996). Por outro lado, recentemente, TORREZAN et al. (2005) calcularam a dose de ciclosporina ingerida por unidade do índice de massa corpórea (mg/U_{IMC}) nos pacientes transplantados e observaram não haver correlação com a HG, apesar das variações de altura e peso.

CEBECI et al. (1996) e THOMAS, NEWCOMBE, OSBORNE (2000) não encontraram correlação entre o tempo de uso da ciclosporina e a hiperplasia gengival em transplantados renais. MARGIOTTA et al. (1996) observaram uma fraca ligação entre a HG e a duração da terapia com a droga. Em relação ao tempo pós-realização do transplante, SPRATT et al. (1999) demonstraram uma correlação altamente relevante entre a duração do mesmo e a hiperplasia gengival.

Um estudo demonstrou que 21% dos pacientes com HG usaram a CsA por menos de um ano e 79% a usaram por mais de um ano. Quando o imunossupressor estava associado a nifedipina, 23% faziam uso da medicação há menos de um ano e 76,5% há mais de um ano. Dentre os indivíduos que não apresentaram esse efeito colateral 42,9% estavam sob tratamento há mais de um ano e 57,1% tratavam-se havia menos de um ano (TORREZAN et al., 2005).

SPOLIDORIO et al. (2005a) realizaram um estudo para avaliar os efeitos

de um longo período de terapia com CsA no tecido gengival. Utilizaram 80 ratos machos administrando 10 mg/kg/dia de ciclosporina, por via subcutânea, durante 60, 120, 180 e 240 dias e os resultados sugerem que o tratamento prolongado com o imunossupressor aumenta a atividade proteolítica dos fibroblastos gengivais, favorecendo a síntese de matriz extracelular normal.

Vários estudos demonstraram que as condições periodontais exercem um papel fundamental na intensidade de desenvolvimento da hiperplasia gengival induzida por drogas. Os parâmetros periodontais utilizados são os índices gengival, de placa bacteriana, de cálculo dentário, de sangramento gengival e a profundidade do sulco gengival (O'VALLE et al., 1995; CEBECI et al., 1996; MARGIOTTA et al., 1996).

Segundo TRACKMAN & KANTARCI (2004), a HG é causada por uma variedade de fatores etiológicos e é exacerbado pelo acúmulo de placa bacteriana local. Vários autores sugerem que a placa induz à inflamação, aumentando o crescimento gengival induzido pela ciclosporina (SEYMOUR, SMITH, 1991; DALEY, WYSOCKI, DAY, 1986; McGAW, LAM, COATES, 1987; PERNU et al., 1992). Segundo FU, NIEH, WIKESJÖ (1997) a placa bacteriana é um co-fator para o desenvolvimento da HG induzida pela ciclosporina, influenciando sua severidade.

Porém, TORREZAN et al. (2005) demonstraram que o índice de placa bacteriana foi semelhante entre os indivíduos com gengivas normais e aqueles com alteração, sugerindo uma fraca relação entre ambas, assim como a correlação entre

a ciclosporina e o índice de placa nos indivíduos que não apresentavam HG (SEYMOUR, SMITH, ROGERS, 1987; PERNU et al., 1992; BÖKENKAMP et al., 1994).

Muitos autores sugerem que o controle efetivo da placa bacteriana, com remoção dos irritantes locais, minimiza a HG, além de evitar sua recidiva, uma vez que a placa desencadeia uma resposta inflamatória, sendo esse um fator de relevância no desenvolvimento desse efeito indesejável, apesar de não prevenir o desenvolvimento da mesma (SEYMOUR, SMITH, 1991; PERNU et al., 1992; SOMACARRERA et al, 1994). No estudo realizado por GÓMEZ et al. (1997), os pacientes foram instruídos quanto a higienização, com a finalidade de auxiliar no tratamento. Porém, eles sugeriram que uma higiene bucal deficiente não é capaz de causar sozinha o crescimento gengival, pois pacientes com excelente higiene bucal apresentaram uma HG *score* 3.

Em um estudo, utilizou-se cinco furões, de um ano de idade, tratados com CsA subcutânea durante 28 dias. Os elementos dentários dos animais foram envolvidos por fio de seda 3-0, ao nível gengival, a fim de facilitar a retenção de placa. Foram colhidas amostras do sulco gengival e da mucosa bucal. O tipo de bactéria predominante foi Cocos no dia zero, no 28^o dia, houve uma diminuição do número destes e aumentou a quantidade de bacilos e espiroquetas na amostra do sulco. No início do experimento, os gêneros mais comuns das bactérias eram *Pasteurella spp.*, *Moraxella spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Rothia spp.* e não continha anaeróbios. No final do estudo, bacilos gram negativos anaeróbios facultativos estavam também presentes em grande número no interior

dos sulcos periodontais e os gêneros predominantes eram *Pasteurella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.*, constituindo, aproximadamente, 2/3 da flora cultivada nesses locais. Os bacilos gram positivos diminuíram no 28º dia, nas amostras obtidas do sulco gengival de animais tratados com CsA., sugerindo que essas bactérias não têm um papel decisivo na patogênese da doença periodontal de furões imunossuprimidos e normais. Os autores observaram que a HG estava presente somente em dentes com ligadura de fio de seda, pois este funciona como um retentor mecânico, criando possibilidades de mudanças na composição da microflora, aumentando a quantidade de anaeróbios. Os gêneros mais comuns eram *Eubacterium spp.*, *Fusobacterium spp.* e espiroquetas (FISHER et al., 1996).

Os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede de bactérias gram negativas induzem a uma resposta imunológica do hospedeiro através da produção de mediadores inflamatórios, tais como COX-2, TNF- α , PDGF, IL-1, IL-6 (HOLT & BRAMANTI, 1991; KJEKIDSEN, HOLMSTRUP, BENDTZEN, 1993). Portanto, essas bactérias podem aumentar, indiretamente, o processo inflamatório, sugerindo que essa reação deva ser importante na interação entre a CsA e os fibroblastos gengivais, promovendo o seu aumento (FU, NIEH, WIKESJÖ, 1997).

Outro fator que poderia influenciar no desenvolvimento da HG é a predisposição imunogenética individual. Estudos demonstraram uma expressão aumentada de antígenos HLA-DR1 e HLA-DR2 do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) classe II em pacientes que não respondiam ao uso da CsA desenvolvendo a hiperplasia gengival e que respondiam,

respectivamente. Os antígenos HLA-A, B e C (MHC classe I) não foram correlacionados com a doença. Esses resultados sugerem que esses determinantes antigênicos funcionariam como um marcador de resistência ao início da HG induzida pela CsA (PERNU et al., 1994; CEBECI et al., 1996). Porém, MARGIOTTA et al. (1996) não encontraram correlação entre os antígenos HLA (HLA-A, HLA-B e HLA-DR) com a HG.

1.5 – Patogênese da HG

Os fibroblastos são os principais tipos de célula do tecido conjuntivo e são responsáveis pela manutenção e renovação da matriz extracelular. Ainda não está claro se o acúmulo de tecido conjuntivo da hiperplasia gengival induzida por ciclosporina é devido a um aumento do número de fibroblastos, ou a um aumento da produção da matriz pelos fibroblastos ou uma diminuição da degradação da matriz ou uma combinação desses mecanismos (JAMES, IRWIN, LINDEN, 1998). Vários trabalhos se baseiam nas anormalidades do metabolismo do colágeno associado com crescimento gengival, outros demonstram o efeito direto da CsA na síntese e no crescimento do colágeno pelos fibroblastos, porém o mecanismo ainda é controverso (SCHINCAGLIA et al., 1992; JAMES, IRWIN, LINDEN, 1995; NEWELL E IRWIN, 1997). Fibroblastos gengivais residentes desempenham um papel primordial no processo de crescimento da gengiva, por serem responsáveis pela produção e renovação da matriz extracelular, através de dois mecanismos: seleção e expansão de subpopulações específicas de fibroblastos no tecido afetado e o efeito direto da droga na função dessas células (NEWELL E IRWIN, 1997; JAMES, IRWIN, LINDEN, 1998).

Muitos autores têm investigado os efeitos diretos da CsA no comportamento do fibroblasto e do colágeno, sugerindo que essa droga

desempenha um papel modulador na atividade fibroblástica, porém isso ainda não está esclarecido. In vitro, a CsA e seu maior metabólito, a OL-17 podem influenciar diretamente os fibroblastos gengivais humanos, causando um aumento na proliferação celular e formação da matriz (JACOBS et al., 1990; ZEBROWSKI, SINGER, BRUNKA, 1986; BARTOLD, 1996; SCHINCAGLIA et al., 1992). Segundo NEWEL & IRWIN (1997) a CsA aumenta a secreção de glicosaminoglicanas pelos fibroblastos, embora o efeito seja dependente da densidade e linhagem celular, pois o crescimento ocorre em culturas de baixa densidade.

Vários estudos têm mostrado a possível presença de duas subpopulações distintas de fibroblastos gengivais – as que respondem e as que não respondem à hiperplasia gengival induzida por drogas (PAGLIARINI et al., 1995; McKEVITT & IRWIN, 1995). Um estudo que reproduziu a HG induzida pela CsA em 100% dos ratos tratados, os autores sugerem que essa subpopulações de fibroblastos gengivais possam não existir nos animais ou que nos tecidos elas devam mudar com a idade (MORISAKI et al., 1997).

Sabe-se que os fibroblastos apresentam heterogenicidade funcional, em relação aos aspectos fundamentais do comportamento da célula como potencial proliferativo, resposta aos fatores de crescimento e biossíntese da matriz, através da atividade de suas subpopulações (HASSELL & STANEK, 1983; IRWIN, PICARDO, ELLIS, 1994). A heterogenicidade fenotípica deles tem sido documentada em locais sadios e doentes de um mesmo tecido, inclusive na mucosa bucal (BRONSON, 1989).

Os fibroblastos gengivais apresentam uma capacidade proliferativa maior, além de aumentar os níveis de colágeno e diminuir os de colagenase ativa em relação aos tecidos normais (NEWELL E IRWIN, 1997). PAIK et al. (2004) demonstraram em seu estudo que o acúmulo de colágeno na hiperplasia gengival induzida por ciclosporina não é causado pelo aumento de sua síntese, mas pela diminuição de sua degradação, através do mecanismo de fagocitose, pois esse imunossupressor não afeta os níveis de transcrição do colágeno tipo I. A reabsorção tecidual diminuída atua como mecanismo contribuinte para a HG induzida por droga (THOMASON, SLOAN, SEYMOUR, 1998). A destruição dos componentes da matriz extracelular ocorre como um resultado da elaboração de proteinases extracelulares, da atividade reduzida da colagenase MMP e inibição da fagocitose do colágeno e ação de enzimas lisossomais (THOMASON, SLOAN, SEYMOUR, 1998; ARORA et al., 2001; TRACKMAN E KANTARCI, 2004).

YOSHIDA, NAGATA, YAMANE (2005) observaram que o tratamento com 200, 400, 800 ng/ml de CsA induziu a um aumento de 23-25% na proliferação de células da mucosa gengival de ratos, mas não afetou no tamanho das mesmas.

Porém, existem estudos que demonstram a CsA e a NIF inibindo a produção de matriz extracelular pelos fibroblastos gengivais e/ou proliferação celular *in vitro* (McKEVITT E IRWIN, 1995; REDLICH et al., 1997). Entretanto, esses achados são inconsistentes com aqueles encontrados *in vivo*, sugerindo que a regulação direta do metabolismo ou proliferação da matriz extracelular pelos

fibroblastos gengivais por essas drogas não é, provavelmente, o mecanismo primário responsável pela HG.

BIRRAUX et al. (2006) demonstraram que a CsA exibe uma inibição dose e tempo dependentes da divisão celular de queratinócitos orais humanos em cultura. Esses resultados sugerem que a HG não é causada pela elevada taxa de proliferação de queratinócitos, mas pelo aumento do tempo de vida dessas células ou devido a alguma alteração na capacidade das células de sofrerem apoptose de modo balanceado. O fator κ B nuclear (NF- κ B) protege os queratinócitos da apoptose prematura, portanto sensibilidade ou resistência à apoptose de queratinócitos e outras células pode ser determinado pelos níveis de NF- κ B entre outras moléculas, como por exemplo Bcl-2 (SAITO et al., 2005).

Estudos recentes demonstram níveis elevados anormais de citocinas específicas no tecido gengival hiperplasiado. Esses achados são de grande importância e sugerem que substâncias que causam a HG, podem alterar o balanço normal de citocinas nos tecidos gengivais, encontrando-se aumentadas, tais como: IL-6, IL-1 β , PDGF-B, FGF-2, CTGF, TGF- β (IACOPINO et al., 1997; JAMES, IRWIN, LINDEN, 1998; RUHL et al., 2004; YOSHIDA, NAGATA, YAMANE, 2005).

O TGF- β é um mediador inflamatório multifuncional que regula a proliferação, diferenciação, morte celular e apoptose assim como ativa diretamente a expressão do gene para a síntese de componentes da matriz extracelular, principalmente o colágeno (ROBERTS et al., 1983; BARNARD, LYONS, MOSES,

1990; BORDER et al., 1992; ATTISANO & WRANA, 1996), além de efeitos inibitórios de degradação da matriz, síntese diminuída de proteases e aumento dos níveis de substâncias que inibem a protease. Induz ao aumento na expressão de colágenos tipo I, III, VI, VII e X, fibronectina e proteoglicanas (MASSGUE, 1990). Além disso, regula fortemente o MMP-13, uma colagenase mais restrita para hidrolisar o colágeno em fibroblastos gengivais humanos. Portanto, participa diretamente dos processos de cicatrização e fibrose. Essa citocina está implicada na patogênese de várias condições fibróticas como: glomerulonefrite, escleroderma, formação de quelóide, na fibrose renal induzida e não-induzida por drogas e na insuficiência cardíaca (JAMES, IRWIN, LINDEN, 1998; WRIGHT, CHAPPLE, MATTHEWS, 2001). A CsA aumenta a produção de TGF- β pelas células renais e linfócitos (AHUJA et al., 1995; PRASHAR et al., 1995). Isso resulta num aumento da síntese e deposição de matriz extracelular nos glomérulos renais, como demonstrado em estudos com anticorpos anti-TGF- β , que bloqueiam a fibrose e a disfunção renais (SHIHAB et al., 1996; ISLAM et al., 2001). Portanto, estudos sugerem que a CsA estimula a produção de TGF- β que leva a fibrose renal e nefropatia. Em um estudo com follow-up de 10 anos, foi observado o desenvolvimento de nefropatia crônica em 40% dos pacientes que faziam uso de CsA, sendo que 56% deles apresentavam o crescimento gengival e 25% não. Os autores sugerem, portanto, que os efeitos tóxicos da CsA na HG e na nefropatia apresentam mecanismos patológicos semelhantes, existindo uma correlação entre ambos os eventos (BORATYNSKA et al., 2004). SAITO et al. (1996) através de avaliação imunohistoquímica da expressão de TGF- β em tecido gengival hiperplásico induzido pela nifedipina e fenitoína também demonstrou um aumento nessa citocina.

Existem três isoformas do TGF- β (TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF- β_3), sendo mediado por três classes de receptores (I, II, III), sendo que somente o I e o II são expressos na membrana celular (IHN, 2002). Um estudo, utilizando a técnica de imuno-histoquímica, demonstrou que todas as suas isoformas e receptores do TGF- β estavam expressos em muitas células dos tecidos gengivais de humanos, sendo que as marcações para o TGF- β_1 e TGF- β_2 se mostraram mais fortemente positivos em tecidos hiperplásicos induzidos pela ciclosporina, quando comparados com o grupo controle, porém somente no primeiro esse aumento encontrava-se significativa. O TGF- β_3 no grupo tratado estava diminuído (WRIGHT, CHAPPLE, MATTHEWS, 2001). Segundo alguns estudos esse fator de crescimento está presente nos estágios finais de cicatrização, moderando os efeitos das outras isoformas e inibindo o processo fibrótico (SHAH, FOREMAN, FERGUSON, 1995).

JAMES, IRWIN, LINDEN (1998) demonstraram através de imuno-histoquímica a presença e distribuição do TGF- β_1 nos tecidos gengivais normais e hiperplásicos induzidos pela terapia com a CsA, sugerindo que essa citocina tenha um papel no acúmulo da matriz extracelular visto na hiperplasia gengival. Estudos com células em cultura têm demonstrado que o TGF- β altera a atividade fibroblástica, incluindo crescimento e metabolismo do colágeno das células gengivais.

Segundo o estudo realizado por YOSHIDA, NAGATA, YAMANE (2005), que utilizaram a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em cultura de

fibroblastos gengivais de ratos, observaram que o tratamento com doses de 400 e 800 ng/ml CsA induziu a um aumento de 80 e 129% a expressão de mRNA para o TGF- β_1 , respectivamente.

WRIGHT et al. (2004) observaram que os níveis de TGF- β_1 estavam aumentados no líquido crevicular em pacientes com crescimento gengival que fazem uso de ciclosporina comparados com o grupo controle que não fazia uso de medicação. Ao se comparar o efeito de dois imunossuppressores, a ciclosporina e o tacrolimus, nos níveis de TGF- β_1 , pôde-se observar que o primeiro promove um aumento na saliva significativamente maior que o segundo, sugerindo que as alterações encontradas nessa complicação possam ser detectadas na saliva (SPOLIDORIO et al., 2005b).

A ocorrência de formas hereditárias de HG contribui para se estudar o fenótipo das células do tecido conjuntivo, *in vitro*, de indivíduos afetados sem a interferência da ação das drogas, além de possibilitar a identificação de genes mutados presentes nessa doença. Estudos têm demonstrado que cultura de fibroblastos gengivais de indivíduos afetados, geralmente, produzem níveis elevados de TGF- β_1 , assim como a expressão de seus receptores, aumentando a produção da matriz extracelular (TIPTON & DABBOUS, 1998; WRIGHT, CHAPPLE, MATTHEWS, 2001; COTRIM et al., 2003; TRACKMAN & KANTARCI, 2004).

O TGF- β_2 é sintetizado principalmente pelo epitélio, enquanto o TGF- β_1 é pelas células hematopoiéticas e tecido conjuntivo. Essa primeira citocina está implicada na resposta inflamatória e subsequente cicatrização durante o processo de

cura em feridas. Um estudo que avaliou o processo de cicatrização de enxertos de pele foi observado que no terceiro dia de pós-operatório, feridas tratadas com TGF- β_2 mostraram um aumento intersticial significativo (SMITH et al., 2000). Segundo BRAHMATEWARI et al. (2000) o tratamento de lesões com anticorpos contra o fator de crescimento β_2 pode ser uma alternativa útil para reduzir a fibrose. SERPERO et al. (2006) demonstraram que o TGF- β_1 e TGF- β_2 estimulam a proliferação de fibroblastos em pólipos nasais humanos.

1.6 – Tratamento da HG

Estudos demonstram o tacrolimus (FK506) e o sirolimus como drogas alternativas à CsA na prevenção da rejeição em transplantes de órgãos (JAMES et al., 2001). A conversão da ciclosporina oral pelo FK506 resultou numa redução do crescimento gengival (KOHNLE et al., 1999; THORP et al., 2000; SPOLIDORIO et al., 2006).

O tratamento da HG inclui a remoção de placa bacteriana, mantendo a higienização adequada, além de procedimentos invasivos como a gengivectomia, apesar das sucessivas recidivas. WALHSTROM, ZAMORA, TEICHMAN (1995), utilizaram a azitromicina (AZI) - um antibiótico semi-sintético, derivado do macrolídeo eritromicina - para tratar infecções respiratórias em dois pacientes transplantados renais que apresentavam HG induzida pela ciclosporina e observaram uma redução gengival após o uso.

Vários estudos demonstraram a eficácia desse antibiótico na regressão desse efeito colateral indesejado causado pelo imunossupressor. O tratamento de cinco dias, com dose de 500mg, é simples, barato, conservador e com rápida efetividade, evitando a cirurgia gengival. A azitromicina é bem tolerada, mas pode apresentar efeitos colaterais como diarreia, dor abdominal, náusea e vômito. Age,

mais comumente, contra bactérias gram positivas e negativas, apresenta rápida absorção oral, não altera os níveis séricos de ciclosporina e os níveis de creatinina (GÓMEZ et al., 1997; WIRNSBERGER et al., 1998, NASH & ZALTZMAN, 1998; CITTERIO et al., 2001; KWUN WH, SUH, KWUN KB, 2003; TOKGOZ et al., 2004; CHAND et al., 2004). CITTERIO et al. (2001) sugerem que o tratamento descrito acima deva ser repetido a cada 8 a 12 meses, a fim de se evitar recidiva, pois em seu estudo seis meses após o tratamento, 14% dos pacientes relataram a recorrência do crescimento gengival e, 17 meses após, essa porcentagem aumentou para 24%. Segundo GÓMEZ et al. (1997) a terapia com a AZI deve começar o mais precocemente possível, assim que surgirem os primeiros sinais da hiperplasia. Alguns autores sugerem que os efeitos do antibiótico compreendem a ação bactericida, redução da inflamação e da estimulação gengival e supressão da síntese protéica pelos fibroblastos, inibindo a proliferação de colágeno (GÓMEZ et al., 1997; NASH & ZALTZMAN, 1998; CITTERIO et al., 2001).

Em um estudo experimental em ratos, PAIK et al. (2004) demonstraram que parar de administrar CsA ou tratar com AZI resultava na diminuição significativa da HG induzida pela ciclosporina. Evidências obtidas pela diminuição macroscópica da largura méso-distal e vestibulo-lingual da papila interdental nos animais que faziam uso de ciclosporina por seis semanas e foram tratados com azitromicina na sétima semana e pela análise histológica. Seus resultados mostraram que a CsA diminui a atividade fagocítica dos fibroblastos gengivais, enquanto a AZI aumenta essa atividade. Demonstraram que esta última não tem efeito na gengiva ou nos fibroblastos gengivais quando administrada sozinha, mas somente quando se usava

concomitantemente o imunossupressor, sugerindo que haja uma interação entre ambas as drogas.

Em 1994, WONG, HODGE, LEWIS descreveram quatro casos de crescimento gengival induzido pela ciclosporina que foram resolvidos com o tratamento de sete dias com 400mg/dia de metronidazol - um fármaco antiprotozoário e antibactericida, efetivo, principalmente, contra microorganismos anaeróbios – desaparecendo a hiperplasia após três a quatro semanas de terapia, recidivando em dois pacientes após um ano, sendo novamente submetido ao tratamento.

CHAND et al. (2004) utilizaram o metronidazol além da azitromicina em pacientes transplantados renais que faziam uso de CsA e desenvolveram a HG. Sugerem que o metronidazol oferece uma melhora na hiperplasia gengival, embora os resultados mostrem que a terapia com a AZI é bem superior, tornando-se uma alternativa terapêutica para essa complicação.

Recentemente, ARGANI et al. (2006) obtiveram resultados significativos com o uso de um dentifrício contendo azitromicina, duas vezes ao dia, durante quatro semanas em pacientes transplantados renais que responderam, satisfatoriamente, com o uso tópico do antibiótico, melhorando todos os parâmetros periodontais, tais como índice de placa, sangramento à sondagem, profundidade do sulco e índice de crescimento gengival. A remissão da hiperplasia gengival continuou até três meses após o término do uso do dentifrício, sugerindo, portanto, uma alternativa terapêutica eficaz e segura, sem efeitos adversos para o paciente.

Em um estudo utilizando a eritromicina, um antibiótico macrolídeo, em ratos diabéticos, obteve-se a melhora na lesão renal, pois a droga reduziu a expressão do gene para TGF- β , a produção de colágeno tipo IV e a atividade do NF- κ B nos tecidos renais (TONE et al., 2005).

Em um estudo piloto realizado no Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental do Centro de Biologia da Reprodução (CBR/UFJF), utilizou-se a roxitromicina – antibiótico macrolídeo, semelhante à azitromicina – para prevenir e tratar a hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina, observando-se uma melhora clinicamente em ambas, com diferença significativa na prevenção, sugerindo que esse fármaco é uma opção conservadora, barata e eficaz na solução dessa complicação.

Foi apresentado no VII Congresso da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO) / 2001 um trabalho utilizando a roxitromicina em humanos. Foi observada uma melhora significativa da HG com o tratamento, representado pela diminuição da profundidade do sulco gengival. Também foi relatado a diminuição no sangramento gengival, sendo bem tolerada pelos pacientes. Portanto, o tratamento de cinco dias com roxitromicina deveria ser considerado uma opção para a HG induzida pela CsA.

O mecanismo de ação pelo qual a roxitromicina promove a regressão da HG induzida pela CsA ainda não é completamente entendido, acredita-se na sua ação

imunomoduladora ser mais importante que sua ação antimicrobiana.

Recentemente, YAMABE et al. (2006) sugerem um efeito inibitório na produção de TGF- β pelas células mesangiais humanas com o uso da roxitromicina, podendo ser eficaz no tratamento da glomeruloesclerose. Nesse estudo o antibiótico macrolídeo inibiu a ativação da tirosina quinase e MAP quinase pela trombina a translocação da proteína NF- κ B p65 induzida pela trombina dentro do núcleo e a ativação dessa proteína regula a produção do TGF- β , sugerindo que a roxitromicina seja uma alternativa terapêutica para a hiperplasia gengival

2 - OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAIS

Avaliar a roxitromicina no tratamento desse efeito adverso causado pelo uso do imunossupressor;

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 - Realizar uma análise histomorfométrica, verificando os efeitos da roxitromicina sobre a espessura do epitélio e conjuntivo na HG em ratos.
- 2 - Avaliar a presença e distribuição do fator de crescimento transformador beta (TGF- β_2) na indução da HG.
- 3 – Avaliar a ação da roxitromicina sobre a expressão de TGF- β_2 em ratos.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Animais de Experimento

Foram utilizados 32 ratos machos, Wistar (procedência do CBR/UFJF), com seis semanas de vida, com peso variando de 100 a 140 gramas para avaliação do efeito terapêutico da roxitromicina (ROX) na hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina.

Os ratos ficaram alojados no CBR/UFJF, em gaiolas de polipropileno com tampas metálicas, medindo 18 x 45 x 30 cm, providas de camas de maravalhas selecionadas, mas não esterilizadas, mamadeira para água e cocho para ração do tipo peletizada. Os animais foram pesados, diariamente, para ajuste da dose das drogas e foram fornecidas água e ração *ad libitum*. A temperatura da sala é controlada ($22^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$), com ventilação natural, no verão e aquecedores no inverno. A iluminação é mista (luz natural e lâmpadas fluorescentes), sendo as

últimas controladas automaticamente para acenderem às 6h e apagarem às 18h.

3.2 – EXPERIMENTO: Avaliação do efeito terapêutico da roxitromicina na HG

O experimento continha quatro grupos com oito animais. Os animais receberam ciclosporina durante cinco semanas com a finalidade de induzir o crescimento gengival e, somente no início da sexta semana, foram tratados com os antibióticos descritos a seguir, com o propósito de regredir a possível hiperplasia gengival instalada. As etapas estão esquematizadas na FIG. 03.

- A)** Animais que receberam 0,2 ml salina estéril (PBS), administração via subcutânea (pH=7,4), diariamente, por seis semanas (n=8) – controle negativo;
- B)** Animais que receberam 10 mg/kg/peso de ciclosporina diariamente, via subcutânea, por seis semanas, diariamente, via subcutânea, iniciando somente no início da sexta semana a administração de PBS (n=8);
- C)** Animais tratados com 10 mg/kg/peso de ciclosporina diariamente, via subcutânea, por seis semanas e 50mg/kg/peso de ampicilina (RITZERFELD, 1979) – antibiótico derivado da penicilina de espectro ampliado, atua inibindo a síntese da parede celular bacteriana, sendo utilizado na odontologia para tratar infecções orodentais (YAGIELA, NEIDLE, DOWD, 2000) - diariamente, via gavagem gástrica, iniciando a sua

administração na sexta semana (n=8) – controle positivo;

- D)** Animais que receberam 10 mg/kg/peso de ciclosporina diariamente, via subcutânea, por seis semanas e foram tratados com roxitromicina, 40 mg/kg/peso (IANARO et al. 2000; UENO et al., 2005), por gavagem gástrica, com início de administração na sexta semana (n=8) – grupo tratado.

Os 32 animais foram divididos em quatro grupos (n=8) e duração total do experimento em seis semanas.

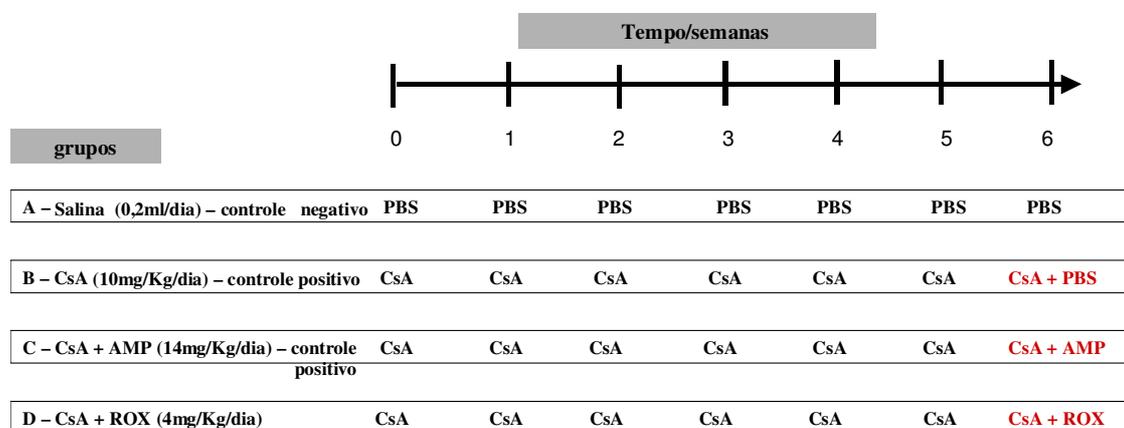


Fig. 04 – Esquema terapêutico dos animais dividido em semanas

Até a 5ª semana foi administrado somente a ciclosporina e somente na 6ª semana iniciou-se o tratamento ou com a roxitromicina ou com a ampicilina.

3.3 – Análise macroscópica da HG

A presença de sinais clínicos de HG foi investigada semanalmente e no final da sexta semana os animais sofreram eutanásia por aprofundamento da anestesia, utilizando Kensol (10 mg/Kg) + Vetanarcol (90 mg/Kg). Em seguida, foi realizado uma moldagem com silicona de condensação (Fig. 04), visando a obtenção de modelo em gesso da região anterior da maxila com a finalidade de se realizar a morfometria da mucosa gengival anterior (MMG) utilizando um paquímetro digital (Fig. 05).



Fig. 04 – Moldagem em silicona de condensação para obtenção de modelo de gesso para análise morfométrica da região maxilar anterior superior dos ratos.



Fig. 05 – Morfometria da mucosa gengival anterior (MMG), utilizando um paquímetro digital

3.4 – Análise histopatológica da HG

As biópsias gengivais foram obtidas da mesma região e foram fixadas em solução de formol a 10%, em seguida, foram desidratadas gradativamente em concentrações crescentes de álcool etílico (70% a 100%), diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina. Os fragmentos incluídos foram submetidos à microtomia, obtendo-se seções de 4 μm de espessura e corado pela técnica da hematoxilina-eosina. As lâminas foram montadas em lamínulas com Entellan® (Merck). Os cortes histológicos foram observados no microscópio óptico com aumento de 50x e 400x. A análise histomorfométrica foi realizada com o objetivo de se quantificar a área de infiltrado inflamatório, número de fibroblastos, espessura do epitélio e do tecido conjuntivo por campo em cada amostra de tecido gengival. As imagens foram capturadas em um aumento de 100x e 400x, utilizando o sistema digital de captura de imagem (filmadora Samsung, SHC) e o software Axio Vision (Zeiss, Berlim, Alemanha), em seguida, as imagens foram avaliadas pelo programa Scion Image® for Windows. Portanto, cada amostra gengival foi submetida à morfometria a partir da captura de toda a área inflamada, número de fibroblastos e espessura da lâmina própria calculando a média aritmética dos campos medidos e expressas em porcentagem.

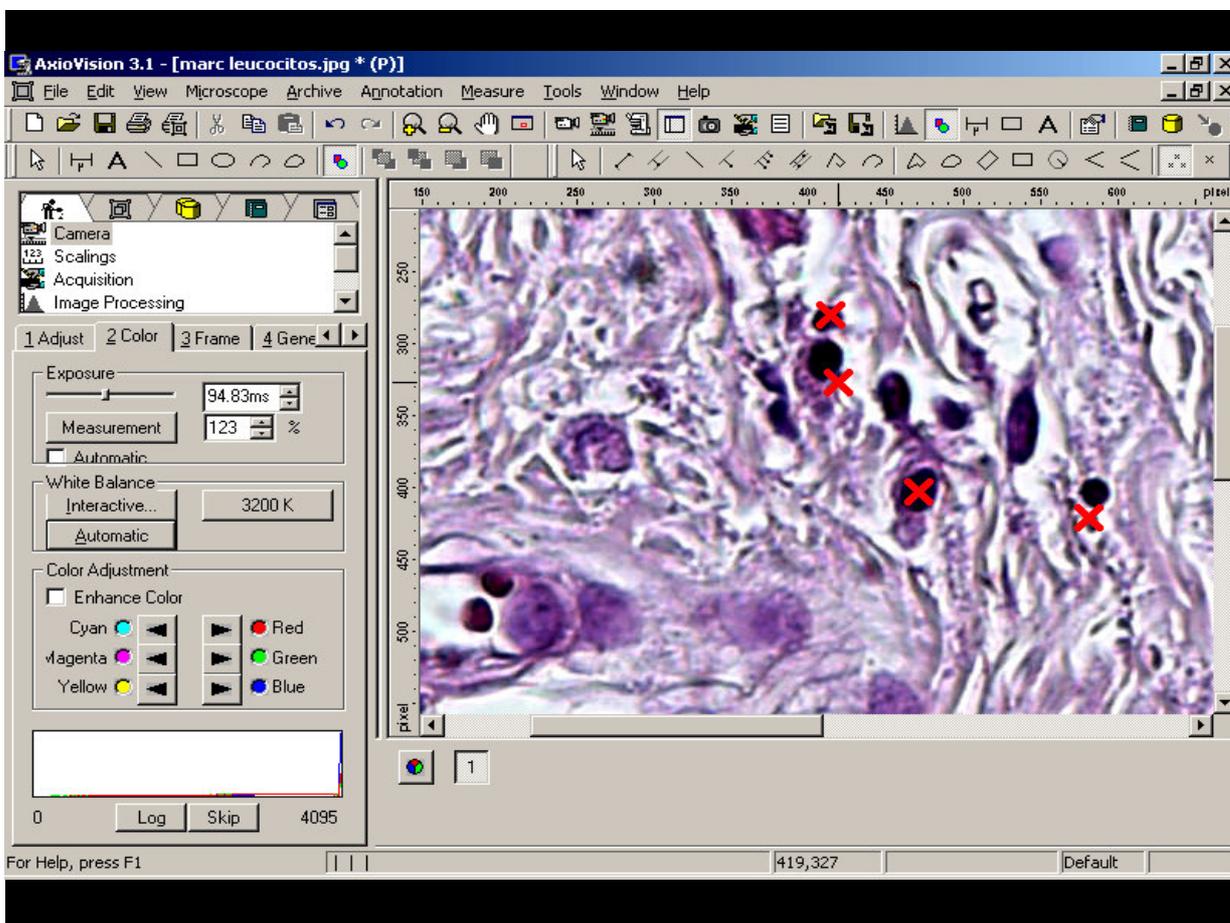


Fig. 06 – Histomorfometria através do software Axio Vision (Zeiss, Berlim, Alemanha). Demonstração de contagem de células inflamatórias (aumento 400x).

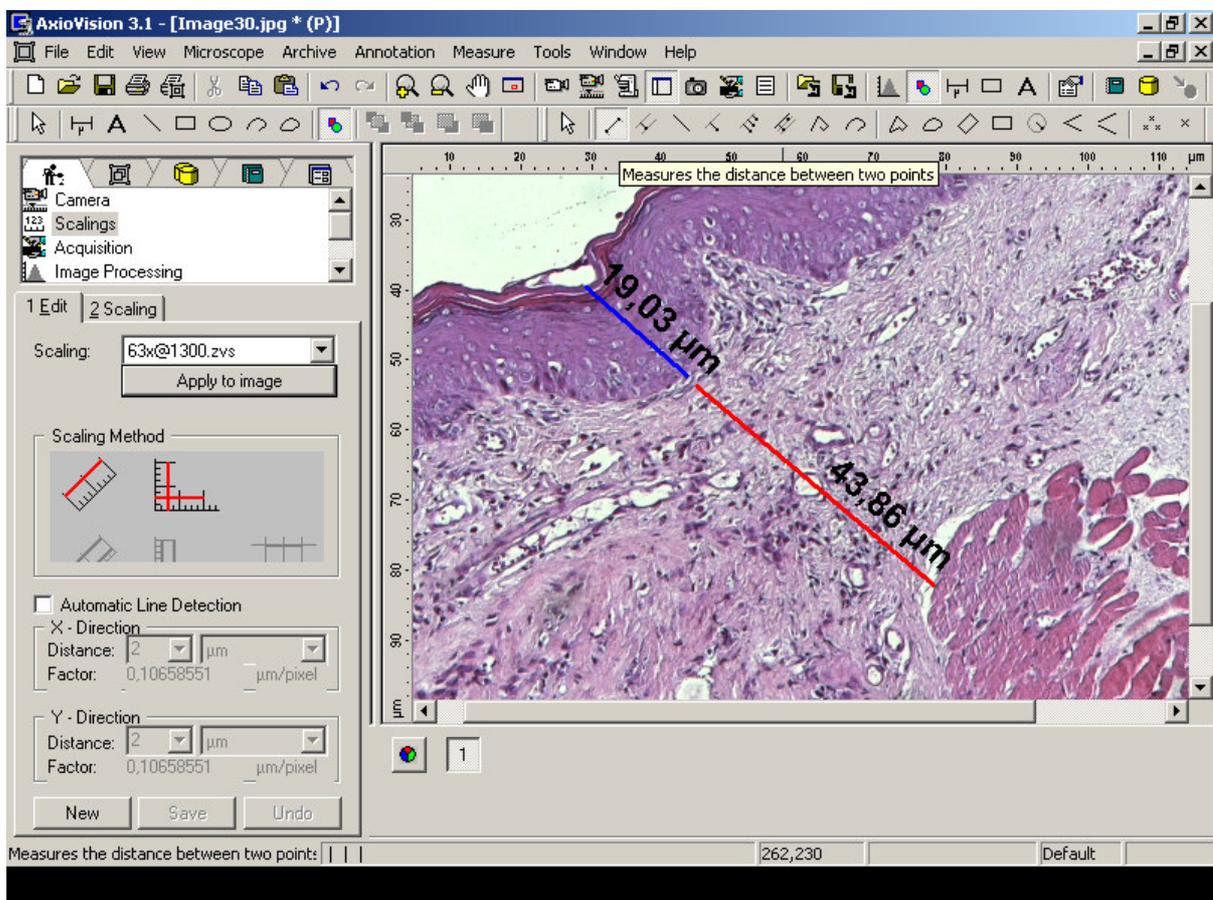


Fig. 07 – Histomorfometria através do software Axio Vision (Zeiss, Berlim, Alemanha). Demonstração de marcação do epitélio e tecido conjuntivo de animal do grupo 1/ controle negativo - mucosa gengival (aumento 100x).

3.6 – Estudo imuno-histoquímico

A presença de TGF- β_2 (diluição 1/20 – Santa Cruz/EUA) foram investigados, através do método do complexo avidina-biotina peroxidase anti-peroxidase, compreendendo as seguintes etapas:

- Desparafinização e hidratação dos cortes do material processado para exame histopatológico;
- Recuperação antigênica com embebição dos cortes em tampão retrieval à 94°C, por 40min.;
- Bloqueio da peroxidase endógena um banho de 30 minutos em solução de peróxido de hidrogênio 3% diluído em água destilada;
- Lavagem em tampão PBS 0,01M/pH 7,4, com três trocas de 5 minutos cada uma;
- Incubação com anticorpo primário (TGF- β_2), em câmara úmida a temperatura ambiente, por uma hora;
- Lavagem em tampão PBS 0,01M/pH 7,4, com três trocas de 5 minutos cada uma;
- Incubação com o anticorpo secundário, em câmara úmida a 37°C por trinta minutos;
- Lavagem em tampão PBS 0,01M/pH 7,4, com três trocas de 5 minutos cada uma;
- Incubação com o complexo peroxidase/anti-peroxidase (PAP), da

mesma espécie animal do anticorpo específico, diluído em PBS, em câmara úmida a 37°C por trinta minutos;

- Lavagem em tampão PBS 0,01M/pH 7,4, com três trocas de 5 minutos cada uma;
- Incubação em substrato diaminobenzidina (DAB) 60mg%, durante 5 minutos em câmara úmida escurecida;
- Lavagem em água corrente e destilada por três minutos;
- Contracoloração com hematoxilina de Harris por 1 minuto e enxágüe em água corrente e destilada;
- Desidratação progressiva em etanol 70%, 80%, 90% e 100%;
- Embebição em xilol, por três vezes;
- Montadas em lamínulas com Entellan

O controle negativo da reação imunohistoquímica foi efetuado omitindo-se a incubação com o anticorpo primário em alguns cortes.

3.7 – Análise estatística

Os dados foram expressos pela média e desvio padrão e para análise estatística foi utilizado o ANOVA e o teste T com nível de significância em $p \leq 0.05$, além do teste post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo nº 039/2005), em reunião realizada em 06/09/2005, de acordo com os Princípios Éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e demais normas vigentes.

4 – RESULTADOS

Os resultados serão apresentados a seguir na forma de artigos. O primeiro artigo foi submetido para a Revista da Associação Brasileira de Odontologia (Revista ABO Nacional) e trata-se de uma revisão do tema hiperplasia gengival induzida por drogas, especificamente, a ciclosporina. O segundo artigo foi submetido para a revista Transplantation Proceedings, referente ao uso da roxitromicina em quatro pacientes da Fundação Imepen (Instituto Mineiro de Estudos e Pesquisas em Nefrologia) com HG. O terceiro artigo foi submetido ao Journal of Oral Pathology and Medicine, abordando os resultados da tese intitulada “Avaliação do Efeito da Roxitromicina na Regressão da Hiperplasia Gengival Induzida pela Ciclosporina em Ratos”, abrangendo os aspectos morfométricos e histomorfométricos e a expressão de TGF- β_2 no tecido gengival dos animais com o uso do antibiótico macrolídeo no tratamento dessa condição adversa.

PAPEL DO TGF- β NA PATOGÊNESE DA HIPERPLASIA GENGIVAL INDUZIDA PELA CICLOSPORINA E POSSIBILIDADES TERAPÊUTICAS ATUAIS

TGF- β ROLE IN GINGIVAL OVERGROWTH PATOGENESIS INDUCED BY CYCLOSPORIN AND ACTUAL THERAPEUTICAL POSSIBILITIES

Simone Aparecida Probst **CONDÉ**¹
Fernando Monteiro **AARESTRUP**²
Beatriz Julião **VIEIRA**³
Ivo Martins **MALTA**⁴
Marcus Gomes **BASTOS**⁵

Trabalho baseado na dissertação de mestrado de Simone Aparecida Probst Conde pelo Programa de Pós-graduação em Saúde Brasileira pela Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

1 Mestranda do Programa de Pós-graduação em Saúde Brasileira/UFJF – e-mail: simoneprobst@ibest.com.br

2 Chefe do Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental/UFJF – Doutor em Patologia/UFF

3 Pesquisadora do Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental/UFJF – Doutor em Patologia/UFF

4 Pesquisador do Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental/UFJF – Farmacêutico/Bioquímico

5 Responsável pela Disciplina e Serviço de Nefrologia da UFJF; Pesquisador do NIEPEN – UFJF e Diretor Executivo da Fundação IMEPEN

Endereço para correspondência: Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – Campus Universitário. Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental - Centro de Biologia da Reprodução (CBR) - Tel: (32) 3229-3250 Bairro Martelos s/nº Cep: 36036-900. Juiz de Fora - MG

Resumo

A hiperplasia gengival (HG) é um efeito colateral comum do uso crônico da ciclosporina (CsA), imunossupressor amplamente usado na prevenção da rejeição em pacientes transplantados. A prevalência média de HG está em torno de 30%, com uma variação entre 10 a 85%, devido a diversos fatores de risco que possam agravá-la como a interação medicamentosa com drogas bloqueadoras de cálcio, idade, dose da ciclosporina, acúmulo de placa bacteriana, predisposição genética, entre outros. Estudos recentes demonstraram níveis elevados de citocinas específicas no tecido gengival hiperplasiado, principalmente o TGF- β , sugerindo que esse fator de crescimento tenha um papel no acúmulo da matriz extracelular visto na hiperplasia gengival. O tratamento para essa complicação, até pouco tempo, era somente cirúrgico. Hoje vários estudos demonstraram a eficácia da azitromicina, antibiótico macrolídeo, na regressão desse efeito colateral indesejado causado pelo imunossupressor. O presente artigo é uma revisão de literatura sobre a hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina, abrangendo suas características clínicas e histopatológicas, fatores predisponentes, patogênese e tratamento.

Palavras-chave: crescimento gengival, ciclosporina, transplante

Abstract

Gingival overgrowth (GO) is a common side effect in patients who have been using an immunosuppressor drug cyclosporine (CsA). There are many factors which have changed the GO prevalence (10-85%), like other drugs associations, plaque control, age, cyclosporine dose, genetics. Several studies have showed high levels of cytokines in the gingival overgrowth tissues, mainly TGF- β , suggesting that growth factor has an important role in extracellular matrix accumulated on GO. The treatment for this complication was surgery, but, today, many studies have been demonstrated the effectiveness of azithromycin, a macrolide antibiotic, on GO. The present article is a revision of literature about gingival overgrowth induced by cyclosporine, clinicals and histopathological aspects, predisposed factors, pathogenesis and treatment.

Keywords: gingival overgrowth, cyclosporine, transplant

1 – INTRODUÇÃO

A hiperplasia gengival (HG) é uma condição patológica, comum em pacientes transplantados, que fazem uso crônico de medicação imunossupressora, particularmente a ciclosporina. A droga atua na supressão da resposta imune mediada por células, sendo amplamente usada para prevenir a rejeição de órgãos transplantados³⁰. Provoca outros efeitos colaterais, tais como, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, hipertensão, hipertricose, entre outros, além de ser utilizada no tratamento de diversas doenças auto-imunes, tais como diabetes mellitus, doença de Behcet, psoríase, esclerose múltipla, líquen plano erosivo, lupus eritematoso sistêmico, pênfigo bolhoso, artrite reumatóide, miastenia gravis, uveítes e diversas glomerulopatias. Sofre biotransformação no fígado, resultando em 14 produtos¹⁹.

Estudos subseqüentes indicaram uma prevalência média de pacientes transplantados dentados, desenvolvendo essa complicação, em torno de 30%, com uma variação entre 10 a 85%^{16,24}. Quando associada a outros medicamentos, como a nifedipina (NIF) - um bloqueador de canal de cálcio - essa prevalência aumenta, assim como a severidade, potencializando o risco. Essas drogas são freqüentemente usadas para o controle da pressão arterial em transplantados renais. O'VALLE et al. (1995) demonstraram uma diferença nos achados morfométricos em pacientes controle, tratados somente com ciclosporina e tratados com a combinação de CsA e NIF, sendo esse último mais acentuado.

O objetivo desse estudo é fazer uma revisão de literatura da hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina, abrangendo suas características clínicas e histopatológicas, fatores predisponentes, patogênese e tratamento.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DA HG

O surgimento da hiperplasia gengival induzida por ciclosporina ocorre, em média, três meses após o início da administração do imunossupressor¹⁸. Surge na papila interdentária, adquirindo uma aparência lobulada, aumentando de tamanho e se estendendo para a superfície dentária¹⁴. A avaliação do grau de HG, mais utilizada em humanos, é determinada de acordo com o índice proposto por SEYMOUR et al. (1985), medindo-se no modelo de gesso superior e inferior anterior à papila interdentária labial e palatal/lingual entre os caninos superiores e inferiores, avaliando o quanto a papila invadiu a superfície incisal dos dentes (*score* 0-3) e a espessura da papila labio-palatal/lingual (*score* 0-2).

As características clínicas vão desde um tecido não inflamado, firme e fibroso até um tecido com aspecto hemorrágico, edemaciado e inflamado, chegando a cobrir a superfície dentária (Fig. 01)²². A hiperplasia gengival induzida por diversos tipos de drogas, é constituída, basicamente, por fibroplasia colágena associada à hiperplasia epitelial. Há presença de cristas epiteliais invaginando o tecido conjuntivo subepitelial, sendo esse último altamente vascularizado e com acúmulo de infiltrado inflamatório, predominantemente mononuclear, representado por macrófagos, linfócitos e plasmócitos (Fig. 02)².

A região mais acometida é a superior e anterior, sendo mais severa próximo aos caninos. Afeta toda a cavidade bucal, incluindo as faces labial, bucal, palatal, lingual¹⁰, sendo mais pronunciado na superfície labial¹⁹. O crescimento gengival induzido pela ciclosporina afeta quase que exclusivamente indivíduos

dentados, porém, THOMAS et al. (2000) encontraram esse efeito colateral em um paciente edêntulo, apesar de outros autores sugerirem que áreas com ausência de dentes não são acometidas pela hiperplasia gengival.

– FATORES PREDISPOANTES

SEYMOUR et al. (1996) sugerem que indivíduos jovens são mais susceptíveis à hiperplasia gengival do que adultos, pois as alterações do metabolismo andrógeno possam estar ligadas a essa predisposição. MARGIOTTA et al. (1996) sugerem que crianças e adolescentes apresentam um aumento do metabolismo dos fibroblastos ou mudanças hormonais comuns nessa faixa etária que explicariam a frequência maior de HG entre eles. Em modelos experimentais, foi sugerido que machos são mais susceptíveis à hiperplasia gengival, devido, possivelmente, aos níveis de progesterona serem menores que os das fêmeas, pois esse hormônio causa um decréscimo na síntese de glicosaminoglicanas, que se encontra aumentada na HG¹⁵. SPRATT et al. (1999) observaram uma proporção significativamente maior de homens do que mulheres apresentando a hiperplasia gengival induzida por CsA, estando também aumentada entre os jovens.

Entretanto, em um estudo brasileiro com pacientes transplantados renais, foi constatado que não houve uma correlação entre o sexo e a idade com a hiperplasia gengival^{16,23}.

Sobre os fatores relacionados com a droga, estudos experimentais, utilizando ratos, demonstraram que o grau de hiperplasia gengival se mostrava mais acentuado à medida que se aumentavam as doses de ciclosporina, sugerindo um efeito dose-dependente em ratos⁹. Em humanos, THOMAS et al. (2000) demonstraram que existe uma correlação entre a dose e os níveis totais de CsA no sangue e a severidade da hiperplasia gengival, diferentemente do que foi encontrado em outros estudos^{13,16,22}. Porém estes últimos sugerem que os níveis sanguíneos do imunossupressor possam interferir na severidade da doença,

enquanto outros indicam que não há influência dos níveis sanguíneos do imunossupressor⁵.

A HG é causada por uma variedade de fatores etiológicos e é exacerbado pelo acúmulo de placa bacteriana local. Muitos autores sugerem que o controle efetivo da placa bacteriana, com remoção dos irritantes locais minimiza a HG, além de evitar sua recidiva, uma vez que a placa desencadeia uma resposta inflamatória, sendo esse um fator de relevância no desenvolvimento desse efeito indesejável, apesar de não prevenir o desenvolvimento da mesma²³.

Outro fator que poderia influenciar no desenvolvimento da HG é a predisposição imunogenética individual. Estudos demonstraram uma expressão aumentada de antígenos HLA-DR1 e HLA-DR2 do MHC classe II em pacientes que não respondiam ao uso da CsA desenvolvendo a hiperplasia gengival e que respondiam, respectivamente. Os antígenos HLA-A, B e C não foram correlacionados com a doença. Esses resultados sugerem que esses determinantes antigênicos funcionariam como um marcador de resistência ao início da HG induzida pela CsA⁵.

– CITOCINAS E PATOGÊNESE DA HG

Há evidências da presença de duas subpopulações distintas de fibroblastos gengivais – os que respondem e os que não respondem à hiperplasia gengival induzida por drogas. Fibroblastos gengivais residentes desempenham um papel primordial no processo de crescimento da gengiva, por serem responsáveis pela produção e renovação da matriz extracelular, através de dois mecanismos: seleção e expansão de subpopulações específicas de fibroblastos no tecido afetado e o efeito direto da droga na função dessas células. Sabe-se que os fibroblastos apresentam heterogenicidade funcional, em relação aos aspectos fundamentais do comportamento da célula como potencial proliferativo, resposta aos fatores de crescimento e biossíntese da matriz, através da atividade de suas subpopulações. A heterogenicidade fenotípica deles tem sido documentada em locais sadios e doentes de um mesmo tecido, inclusive na mucosa bucal. Os fibroblastos gengivais apresentam uma capacidade proliferativa maior, além de aumentar os níveis de colágeno e diminuir os de colagenase ativa em relação aos tecidos normais. A destruição dos componentes da matriz extracelular ocorre como um resultado da elaboração de proteinases extracelulares, da atividade reduzida da colagenase da matriz metaloproteinase (MMP) e inibição da fagocitose do colágeno e ação de enzimas lisossomais¹⁴.

Muitos autores têm investigado os efeitos diretos da CsA no comportamento do fibroblasto e do colágeno, sugerindo que essa droga desempenha um papel modulador na atividade fibroblástica, porém ainda não está esclarecido. Segundo NEWEL & IRWIN (1997) a CsA aumenta a secreção de glicosaminoglicanas pelos fibroblastos, embora o efeito seja dependente da

densidade e linhagem celular, pois o crescimento ocorre em culturas de baixa densidade.

Vários estudos demonstram níveis elevados anormais de citocinas específicas no tecido gengival hiperplasiado, sendo esses achados de grande importância, pois sugerem que substâncias que causam a HG, podem alterar o balanço normal de citocinas nos tecidos gengivais, encontrando-se aumentadas, tais como: IL-6, IL-1 β , PDGF-B, FGF-2, CTGF, EGF, TGF- β ^{21,30}.

O TGF- β é um mediador inflamatório multifuncional que regula a proliferação, diferenciação, morte celular e apoptose assim como ativa diretamente a expressão do gene para a síntese de componentes da matriz extracelular, principalmente o colágeno, além de efeitos inibitórios de degradação da matriz, síntese diminuída de proteases e aumento dos níveis de substâncias que inibem a protease. Induz ao aumento na expressão de colágenos tipo I, III, VI, VII e X, fibronectina e proteoglicanas. Portanto, participa diretamente dos processos de cicatrização e fibrose. Essa citocina está implicada na patogênese de várias condições fibróticas como: glomerulonefrite, escleroderma, formação de quelóide, na fibrose renal induzida e não-induzida por drogas e na insuficiência cardíaca²⁷. A CsA aumenta a produção de TGF- β pelas células renais e linfócitos. Isso resulta num aumento da síntese e deposição de matriz extracelular nos glomérulos renais, como demonstrado em estudos com anticorpos anti-TGF- β , que bloqueiam a fibrose e a disfunção renais¹². Portanto, estudos demonstram que a CsA estimula a produção de TGF- β que leva a fibrose renal e nefropatia. Em um estudo com follow-up de 10 anos, foi observado o desenvolvimento de nefropatia crônica em 40% dos pacientes que faziam uso de CsA, sendo que 56% deles apresentavam o

crescimento gengival e 25% não. Os autores sugerem, portanto, que os efeitos tóxicos da CsA na HG e na nefropatia apresentam mecanismos patológicos semelhantes, existindo uma correlação entre ambos os eventos³.

Existem três isoformas do TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3), sendo mediado por três classes de receptores (I, II, III), sendo que somente o I e o II são expressos na membrana celular¹¹. Um estudo, utilizando a técnica de imunohistoquímica, demonstrou que todas as suas isoformas e receptores do TGF- β estavam expressos em muitas células dos tecidos gengivais de humanos, sendo que as marcações para o TGF- β 1 e o receptor I se mostraram mais fortemente positivas em tecidos hiperplásicos induzidos pela ciclosporina, quando comparados com o grupo controle²⁷.

Segundo o estudo realizado por YOSHIDA et al. (2005), que utilizaram a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em cultura de fibroblastos gengivais de ratos, observaram que o tratamento com doses de 400 e 800 ng/ml CsA induziu a um aumento de 80 e 129% a expressão de mRNA para o TGF- β 1, respectivamente. WRIGHT et al. (2004) observaram que os níveis de TGF- β 1 estavam aumentados no fluido gengival em pacientes com crescimento gengival que fazem uso de ciclosporina comparado com o grupo controle que não fazia uso de medicação. Estudos têm demonstrado que cultura de fibroblastos gengivais de indivíduos afetados, geralmente, produzem níveis elevados de TGF- β 1, assim como a expressão de seus receptores, aumentando a produção da matriz extracelular^{7,27}. Ao se comparar o efeito de dois imunossupressores, a ciclosporina e o tacrolimus, nos níveis de TGF- β 1, pôde-se observar que o primeiro promove um aumento na saliva significativamente maior que o segundo, sugerindo que as alterações

encontradas nessa complicação possam ser detectadas na saliva ²¹.

O TGF- β_2 está relacionado com a resposta inflamatória e subsequente cicatrização durante o processo de cura em feridas. Um estudo que avaliou o processo de cicatrização de enxertos de pele foi observado que no terceiro dia de pós-operatório, feridas tratadas com TGF- β_2 mostraram um aumento intersticial significativo²⁰. Segundo BRAHMATEWARI et al. (2000) o tratamento de lesões com anticorpos contra o fator de crescimento β_2 pode ser uma alternativa útil para reduzir a fibrose. SERPERO et al. (2006) demonstraram que o TGF- β_1 e TGF- β_2 estimulam a proliferação de fibroblastos em pólipos nasais humanos.

- TRATAMENTO DA HG: conceitos atuais

Estudos demonstram o tacrolimus (FK506) e o sirolimus como drogas alternativas à CsA na prevenção da rejeição em transplantes de órgãos. A conversão da ciclosporina oral pelo FK506 resultou numa redução do crescimento gengival²⁴.

O tratamento da HG inclui a remoção de placa bacteriana, mantendo a higienização adequada, além de procedimentos invasivos como a gengivectomia, apesar das sucessivas recidivas. Porém, WALHSTROM et al. (1995) coincidentemente, utilizaram a azitromicina - um antibiótico semi-sintético, derivado do macrolídeo eritromicina - para tratar infecções respiratórias em dois pacientes transplantados renais que apresentavam HG induzida pela ciclosporina e observaram uma redução gengival após o uso.

Vários estudos demonstraram a eficácia desse antibiótico na regressão desse efeito colateral indesejado causado pela CsA. O tratamento de cinco dias, com dose de 500mg, é simples, barato, conservador e com rápida efetividade, evitando a cirurgia gengival. A azitromicina é bem tolerada, mas pode apresentar efeitos colaterais como diarreia, dor abdominal, náusea e vômito, age, mais comumente, contra bactérias gram positivas e negativas, apresenta rápida absorção oral, não altera os níveis séricos de ciclosporina e os níveis de creatinina^{6,8,10}. CITTERIO et al. (2001) sugerem que o tratamento descrito acima deva ser repetido a cada 8 a 12 meses, a fim de se evitar recidiva, pois em seu estudo seis meses após o tratamento, 14% dos pacientes relataram a recorrência do crescimento gengival e, 17 meses após, essa porcentagem aumentou para 24%. Segundo GÓMEZ et al. (1997) a terapia com a azitromicina deve começar o mais

precocemente possível, assim que surgirem os primeiros sinais da hiperplasia. Alguns autores sugerem que os efeitos do antibiótico compreendem a ação bactericida, redução da inflamação e da estimulação gengival e supressão da síntese protéica pelos fibroblastos, inibindo a proliferação de colágeno^{8,10}.

Em 1994, WONG et al. descreveram quatro casos de crescimento gengival induzido pela ciclosporina que foram resolvidos com o tratamento de sete dias com 400mg/dia de metronidazol - um fármaco antiprotozoário e antibactericida, efetivo, principalmente, contra microorganismos anaeróbios – desaparecendo a hiperplasia após três a quatro semanas de terapia, recidivando em dois pacientes após um ano, os quais foram novamente submetidos ao tratamento.

CHAND et al. (2004) utilizaram o metronidazol além da azitromicina em pacientes transplantados renais que faziam uso de CsA e desenvolveram a HG. Sugerem que o metronidazol oferece uma melhora na hiperplasia gengival, embora os resultados mostrem que a terapia com a azitromicina é bem superior, tornando uma alternativa terapêutica para essa complicação.

Recentemente, ARGANI et al. (2006) obtiveram resultados significativos com o uso de um dentifrício contendo azitromicina, duas vezes ao dia, durante 4 semanas em pacientes transplantados renais que responderam, satisfatoriamente, com o uso tópico do antibiótico, melhorando todos os parâmetros periodontais, tais como índice de placa, sangramento à sondagem, profundidade do sulco e índice de crescimento gengival. A remissão da hiperplasia gengival continuou até três meses após o término do uso do dentifrício, sugerindo, portanto, uma alternativa terapêutica eficaz e segura, sem efeitos adversos para o paciente.

Apresentamos no VI Congresso de Transplantes em Vitória (2003)

nosso trabalho utilizando a roxitromicina – antibiótico macrolídeo, semelhante à azitromicina – em um grupo de cinco pacientes transplantados renais com hiperplasia gengival de moderada a severa, apresentando uma regressão significativa da mesma com o uso da medicação durante cinco dias. Recentemente, Yamabe et al. (2006) sugerem um efeito inibitório na produção de TGF- β pelas células mesangiais humanas com o uso da roxitromicina, podendo ser eficaz no tratamento da glomeruloesclerose.

3 – CONCLUSÃO

De acordo com diversos estudos relacionados ao crescimento gengival induzido pela ciclosporina, já está comprovado a atuação de diversas citocinas na indução desse efeito colateral, tais como o TGF- β , PDGF-B, IL-6, IL-1 β , , FGF-2, CTGF, EGF.

A eficácia da antibioticoterapia (antibióticos macrolídeos) no tratamento clínico da HG transcende a ação antimicrobiana e, possivelmente, está relacionada a sua ação imunomoduladora.



Fig. 01 - A - Paciente da Fundação Imepen (Instituto Mineiro de Estudos e Pesquisa em Nefrologia), do sexo masculino, 64 anos, transplantado renal há sete anos e oito meses, fazendo uso de ciclosporina. Notar a presença de tecido hiperplásico gengival generalizado, higiene bucal precária com sangramento espontâneo, secreção purulenta e cálculo dentário disseminado.

B - Aspecto histopatológico de gengiva do paciente da Fig. 01, apresentando hiperplasia do epitelial com hiperqueratose e acantose. No tecido conjuntivo observamos fibroplasia colágena acentuada.

4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARGANI H, POURABBAS R, HASSANZADEH D. Treatment of Cyclosporine-induced gingival overgrowth with Azithromycin-containing toothpaste. *Exp Clin Transplant*; 2006 4(1): 420-424.
2. BOLTCHI FE, REES TD, IACOPINO A M. Cyclosporine A induced gingival overgrowth: a comprehensive review. *Quintessence Int*. 1999; 30: 775-783.
3. BORATYNSKA M, RADWAN-OCZKO M, FALKIEWICZ K, KLINGER M, SZYBER P. Gingival overgrowth in kidney transplant recipients treated with cyclosporine and its relationship with chronic graft nephropathy. *Transplant Proc*. 2004; 35 (6): 2238-2240.
4. BRAHMATEWARI, J.; SERAFINI, A.; SERRALTA, V. et al. The effects of topical transforming growth factor-beta2 and anti-transforming growth factor-beta2,3 on scarring in pigs. *J Cutan Med Surg*. 2000 4(3): 126-131.
5. CEBECI I, KANTARCI A, FIRATLI E, AYGÜN S, TANYERI H, AYDIN AE et al. Evaluation of the frequency of HLA determinants in patients with gingival overgrowth induced by cyclosporine-A. *J Clin Periodontol.* 1996; 23: 737-742.
6. CHAND DH, QUATTROCCHI J, POE SA, TEREZHALMY GT, STRIFE CF, CUNNINGHAM RJ. Trial of metronidazole vs. azithromycin for treatment of cyclosporine-induced gingival overgrowth. *Pediatr Transplant*. 2004; 8: 60-64.
7. CHEN Y-T, TU H-P, CHIN Y-T, SHEN E-C, CHIANG CY, GAU CH. Upregulation of Transforming Growth Factor- β 1 and Vascular Endothelial Growth Factor gene and protein expression in Cyclosporin-induced overgrowth edentulous gingival in rats. *J Periodontol*. 2005; 76: 2267-2275.
8. CITTERIO F, DI PINTO MT, BORZI MC et al. Azithromycin treatment of gingival hyperplasia in kidney transplant recipients is effective and safe. *Transplant Proc*. 2001; 33: 2134-2135.
9. FU E, NIEH S, CHANG H-L, WANG SL. Dose-dependent gingival overgrowth induced by cyclosporin in rats. *J Periodontol.* 1995; 66: 594-598.
10. GÓMEZ E, SÁNCHEZ-NUÑES M, SÁNCHEZ JE, CORTE C, AGUADO S, PORTAL C, BALTAR J, ALVAREZ-GRANDE J. Treatment of cyclosporin-induced gingival hyperplasia with azithromycin. *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 12: 2694-2697.
11. IHN H. Pathogenesis of fibrosis: Role of TGF- β and CTGF. *Curr Opin Rheumatol*. 2002; 14: 681-685.

12. ISLAM M, BURKE JF, McGOWAN T. A et al, Effect of anti-transforming growth factor-beta antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction. *Kidney Int.* 2001; 59: 498-506.
13. MARGIOTTA V, PIZZO I, PIZZO G, BARBARO A. Cyclosporin-and nifedipine-induced gingival overgrowth in renal transplant patients: correlations with periodontal and pharmacological parameters, and HLA- antigens. *J Oral Pathol Med.* 1996; 25: 128-134.
14. NEWELL J, IRWIN CR. Comparative effects of cyclosporin on glycosaminoglycan synthesis by gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 1997; 68: 443-447.
15. NISHIKAWA S, NAGATA T, MORISAKI I, OKA T, ISHIDA H. Pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. *J Periodontol.* 1996; 67: 463-471.
16. O´VALLE F, MESA F, ANEIROS J, GÓMEZ-MORALES M, LUCENA MA, RAMÍREZ C. et al. Gingival overgrowth induced by nifedipine and cyclosporin A. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 591-597.
17. SERPERO, L.; PETECCHIA, L.; SABATINI, F. et al. The effects of transforming growth factor (TGF- β_1 and TGF- β_2) on nasal polyp fibroblast activities involved upper airway remodeling: Modulation by fluticasone propionate. *Immunol Lett.* 2006; 105: 61-67.
18. SEYMOUR RA, SMITH DG, TURNBULL DN. The effects of phenytoin and sodium valproate on the periodontal health of adult epileptic patients. *J Clin Periodontol.* 1985; 12: 413-419.
19. SEYMOUR RA, THOMASON JM, ELLIS JS. The pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol.* 1996; 23: 165-175.
20. SMITH, P.D.; POLO, M.; SOLER, P.M. et al. Efficacy of growth factors in the accelerated closure of interstices in explanted meshed human skin grafts. *J Burn Care Rehabil.* 2000; 21: 5-9.
21. SPOLIDORIO, L.C.; HOLZHAUSEN, M.; SPOLIDORIO, D.M.P. et al. Cyclosporin but not tacrolimus significantly increases salivary cytokine contents in rats. *J Periodontol.* 2005; 76: 1520-1525.
22. SPRATT H, BOOMER S, IRWIN CR, MARLEY JJ, JAMES JA, MAXWELL P et al. Cyclosporine associated gingival overgrowth in renal transplant recipients. *Oral Dis.* 1999; 5: 27-31.
23. THOMAS DW, NEWCOMBE RG, OSBORNE GR. Risk factors in the development of cyclosporine-induced gingival overgrowth. *Transplant.* 2000; 69(4): 522-526.

24. THORP M, DE MATTOS A, BENNETT W et al. The effect of conversion from cyclosporine to tacrolimus on gingival hyperplasia, hirsutism and cholesterol. *Transplantation*. 2000; 69: 1218-1220.
25. WAHLSTROM E, ZAMORA JV, TEICHMAN S. Improvement in cyclosporine associated gingival hiperplasia with azithromycin therapy. *N Engl J Med*. 1995; 332-353.
26. WONG W, HODGE MG, LEWIS A, SHARPSTONE P, KINGSWOOD JC. Resolution of cyclosporin-induced gingival hypertrophy with metronidazole. *Lancet* .343-386, 1994.
27. WRIGHT H.J, CHAPPLE ILC, MATTHEWS JB. TGF- β isoforms and TGF- β receptors in drug-induced gingival and hereditary gingival overgrowth. *J Oral Pathol* 30: 281-289, 2001.
28. WRIGHT H.J, CHAPPLE ILC, BLAIR F. et al. Crevicular flui levels of TGF- β 1 in drug-induced gingival overgrowth. *Oral Biol* 49: 421-425, 2004
29. YAMABE H, SHIMADA M, KAIZUKA M, NAKAMURA M, KUMASAKA R, MURAKAMI RI et al. Roxithromycin inhibits transforming growth factor- β production by cultured human mesangial cells. *Nephrology*. 2006; 11: 524-530.
30. YOSHIDA T, NAGATA J, YAMANE A. Growth factors and proliferation of cultured rat gingival cells in response to cyclosporin A. *J Periodont Res*. 2005; 40: 11-19.

ROXITHROMYCIN REDUCES CYCLOSPORINE-INDUCED GINGIVAL HYPERPLASIA IN RENAL TRANSPLANT PATIENTS

Abstract

Gingival overgrowth (GO) is a common side effect of the chronic use of cyclosporine (CsA), an immunosuppressive drug which is widely used to prevent rejection in transplant patients. The average prevalence of GO is around 30%, with variation between 10% and 85% due to diverse aggravating risk factors such as drug interaction with calcium channel blockers, age, dose of cyclosporine, accumulation of bacterial plaque, and genetic predisposition. Recent studies have demonstrated elevated levels of specific cytokines in hyperplastic gingival tissue, particularly TGF- β , which suggests that this growth factor plays a role in the accumulation of the extracellular matrix. Treatment for this complication, until recently, was only surgical. Nowadays, several studies have been conducted to determine the effect of antibiotic treatment on the regression of gingival overgrowth. In the present study we used roxithromycin, a macrolide antibiotic which has presented inhibitory effect on TGF- β production by inflammatory cells. The results suggest that roxithromycin (ROX) may be an important therapeutic tool used to reduce cyclosporine-induced gingival overgrowth.

Key words: gingival overgrowth, cyclosporine, transplant.

Simone Aparecida Probst **CONDÉ**¹
Fernando Monteiro **AARESTRUP**²
Beatriz Julião **VIEIRA**³
Ivo Martins **MALTA**⁴
Luciana Valente **BORGES**⁵
Marcus Gomes **BASTOS**⁶

1 Post-graduate Program in Brazilian Health, Federal University of Juiz de Fora/UFJF.

2 Laboratory of Immunopathology and Experimental Pathology, Federal University of Juiz de Fora. PhD in Pathology from Fluminense Federal University/UFF

3 Laboratory of Immunopathology and Experimental Pathology, Federal University of Juiz de Fora. PhD in Pathology from Fluminense Federal University/UFF.

4 Pharmacista/Biochemist

5 Laboratory of Immunopathology and Experimental Pathology, Federal University of Juiz de Fora - UFJF; Ph.D. in Pathology from the Universidade Federal Fluminense - UFF - Niterói (RJ), Brazil

6 Department of Nefrology, NIEPEN Institute, IMEPEN Foundation, Federal University of Juiz de Fora/UFJF.

Correspondence: S.A.P. Condé, Programa de Pós-graduação em Saúde Brasileira/UFJF, Campus da UFJF, bairro Martelos, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil. E-mail: simoneprobst@ibest.com.br

INTRODUCTION

Cyclosporine (CsA) is a hydrophobic neutral cyclic polypeptide composed of eleven amino acids and made from the fungus *Tolypocladium inflatum gams*. It specifically acts in suppressing the immune response mediated by T cells. It goes through biotransformation in the liver, resulting in 14 metabolic products, of which 90% is excreted in feces and 10% eliminated by the kidneys.

Gingival overgrowth is one of the side effects caused by the chronic use of cyclosporine (CsA), which is employed to prevent rejection of transplanted organs and to treat several autoimmune diseases, such as diabetes mellitus, Behcet's disease, psoriasis, multiple sclerosis, erosive lichen planus, systemic lupus erythematosus, bullous pemphigoid, rheumatoid arthritis, myasthenia gravis, uveitis, and various glomerulopathies^{1,2}.

An immunohistochemical study has suggested that TGF- β expression is increased in gingival overgrowth induced by the drugs nifedipine and phenytoin compared with control tissue³. Studies have shown that TGF- β is a multifunctional inflammatory mediator. It has a relation with the regulating cell proliferation and differentiation as well as directly activating gene expression for the synthesis of extracellular matrix components including collagenous proteins⁴.

GO treatment includes removing bacterial plaque, maintaining adequate oral hygiene, and also includes invasive procedures, such as gingivectomy. Nevertheless, that condition frequently relapses. Nowadays, the diary treatment with 300mg of azithromycin (AZI) for five days is simple, cheap, conservative, quickly effective, and avoids gingival surgery. It acts mostly against gram-positive and negative bacteria,

has quick oral absorption, does not alter serum levels of cyclosporine or levels of creatinine. Azithromycin is well tolerated, but can produce side effects, such as diarrhea, abdominal pain, nausea and vomiting^{5,6,7}.

Yamabe et al⁸ suggested that the use of roxithromycin has an inhibitory effect on the production of TGF- β by human mesangial cells, and can be efficient in the treatment of glomerulosclerosis. The mechanisms that roxithromycin inhibited TGF- β production are not clear, but in this study the drug did not inhibit the activation of tyrosine kinase and MAP kinase by thrombin. ROX suppressed the thrombin-induced translocation of NF- κ B p65 protein into the nucleus. It is suggested that the activation of NF- κ B regulates TGF- β production, thus ROX inhibited TGF- β production via the inhibition of NF- κ B, therefore in this study we used roxithromycin as an alternative therapeutic agent in the treatment of gingival overgrowth.

PATIENTS AND METHODS

Four renal transplant patients (3 men, 1 woman) were recruited from the NIEPEN (Interdisciplinary Nucleus for Study, Research, and Extension of the Federal University of Juiz de Fora). All the patients had used cyclosporine and developed a moderate to severe gingival overgrowth. The demographic data (Table 1) were evaluated before and after the treatment as well as gingival overgrowth was diagnosed on the basis of measurements of sulcus and it was confirmed as positive when the probing depth ≥ 4 mm, without exhibiting loss of periodontal attachment (pseudopockets)⁹. A millimeter probe measured gingival sulci on the vestibular, lingual, mesial and distal teeth surfaces. Sulcus depths are represented graphically in Fig. 01-04. The patients were treated with 300 mg of roxithromycin for 5 days. Statistical analysis considered the evaluation before and after the treatment, comparing the same teeth surface. The Wilcoxon test was used to determine the mean sulcus depth, comparing the values.

RESULTS

Demographics characteristics are on the Table 1. At the beginning of therapy moderate to severe gingival overgrowth was present in all patients and abundant bleeding when brushing tooth, during in the first exam. Three patients (75%) had presented gingival sensibility and two patients (50%) had been submitted to gingivectomy. Five days of roxythromycin treatment reduced the depth of all gingival sulci (vestibular, lingual, mesial and distal) in all patients (Fig. 05-A,B). Gingival bleeding decreased as well as pain.

Table 1 – Demographic Characteristics of Renal Transplant Patients

Sex (male/female)	3/1
Age (year)	55.75 ± 9.53
Time since transplant (month)	46.50 ± 31,12
Immunosuppressive drugs	
Cyclosporine + Prednisone	1
Cyclosporine + Azathioprine	2
Cyclosporine + Prednisone + Azathioprine	1
Anti-hypertensive drugs	
Nifedipine	2

Fig. 1-4: Probing depth (vestibular – 1; lingual – 2; mesial – 3; distal – 4) in renal transplant patients before (exam 1) and after (exam 2) the roxithromycin treatment. Note that all the patients and all the faces measurements reduced.

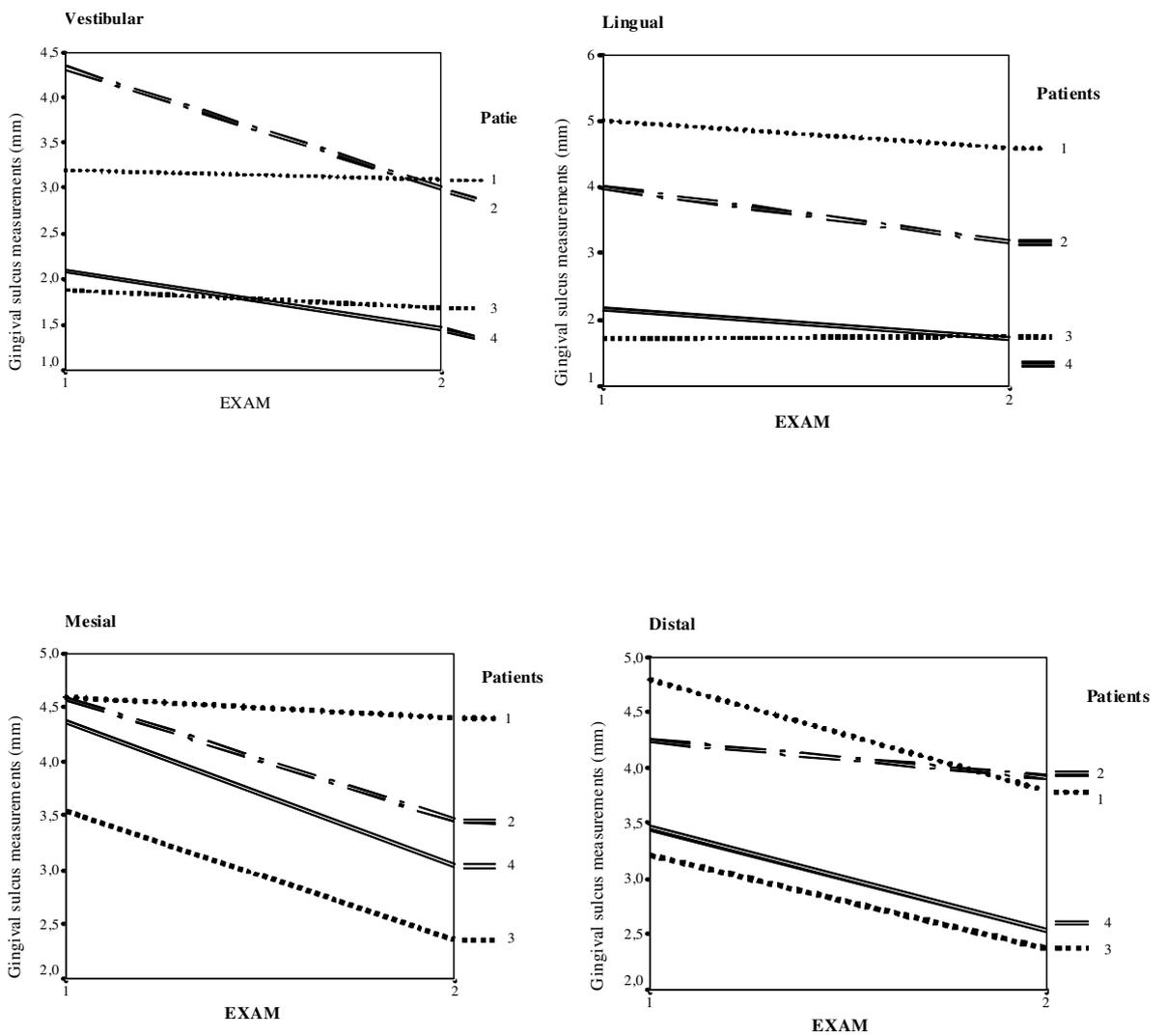
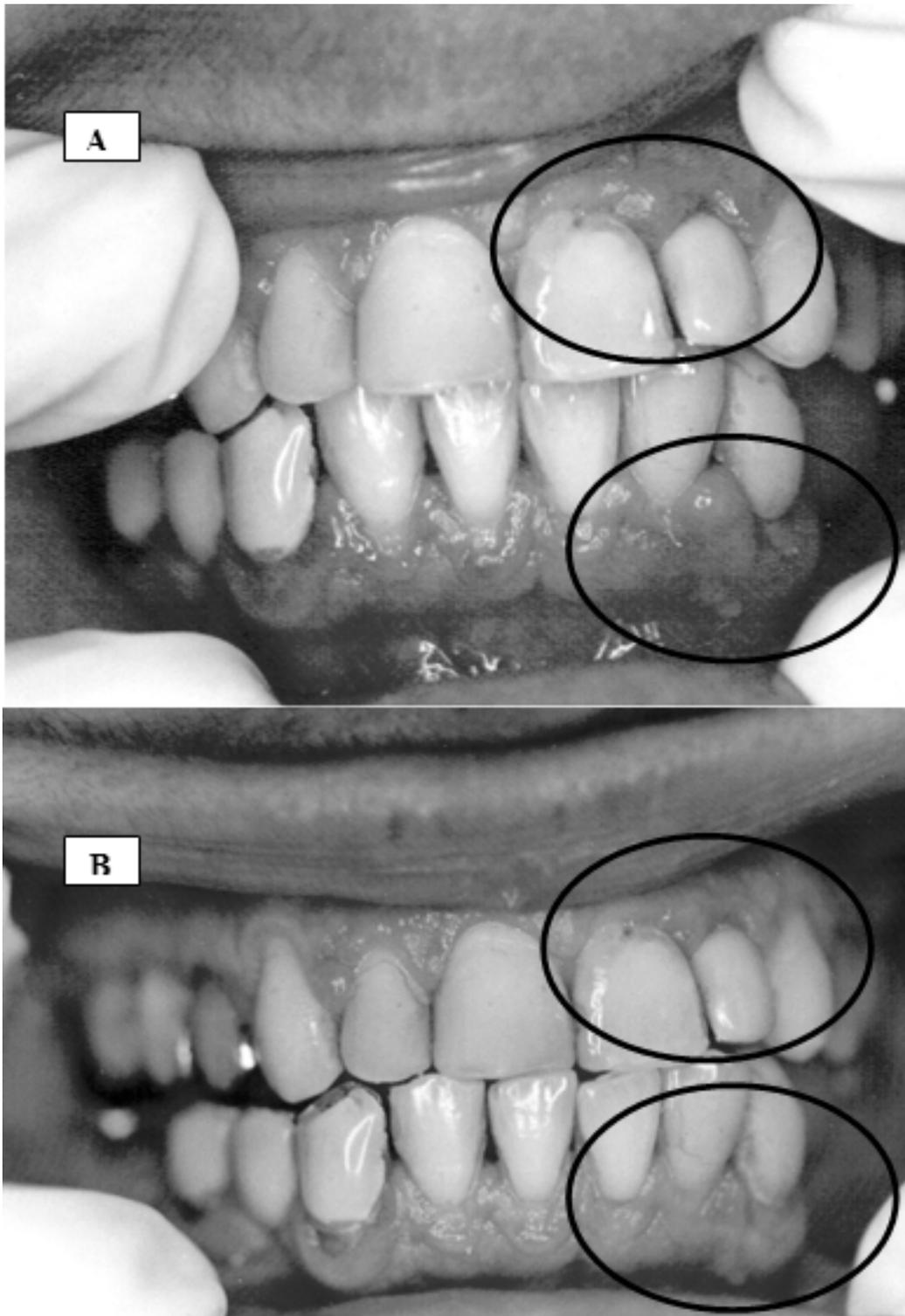


Fig. 02 - **A** – Patient from the Imepen Foundation, female, 47 years old, underwent renal transplant one year and six months ago, treated with cyclosporine. Edematous and erythematous gingiva. Highlighted, gingival hyperplasia in the upper and lower canine region, before 5-day treatment with roxithromycin. **B** - Patient after 5-day treatment with roxithromycin. Note the regression of GH in the highlighted region; volume and gingival coloring are normal.



DISCUSSION

As reported in the literature, GO appears on the interdental papilla, developing a lobulated appearance, growing in size and spreading to the dental surface¹⁰. Clinical characteristics range from non-inflamed, firm, fibrous tissue to tissue with a hemorrhagic, edematous and inflamed aspect, which goes so far as to cover the dental crown¹¹. Clinically gingival hyperplasia begins at the interdental papillae, more commonly in anterior than in posterior region, and frequently on labial than on lingual surfaces and it is most severe near the canines⁵. Similar characteristics were observed in our patients. In the present study, we observed that the treatment of roxithromycin by five days decrease gingival overgrowth in renal transplanted patients.

Various studies have shown the effectiveness of azithromycin in the regression of gingival overgrowth caused by the immunosuppressant, with a five-day treatment with a 500 mg dose. Citterio et al⁶ suggested that the treatment described above should be repeated every 8 to 12 months, in order to avoid relapse, since, in his study, 14% of the patients reported recurrence of gingival growth six months after the treatment, and this percentage grew to 24% 17 months after the treatment. According to Gómez et al⁵ therapy with AZI should start as soon as possible, the first signs of hyperplasia arise. Some authors suggest that effects of the antibiotic include bacterial action, reduction of inflammation and gingival stimulation, and suppression of protein synthesis by fibroblasts, inhibiting the proliferation of collagen^{5,6}.

Recently, Argani et al²⁰ obtained significant results with the use of a dentifrice that contained azithromycin two times a day, for 4 weeks on renal transplant patients,

who responded satisfactorily to the topical use of the antibiotic, since there was improvement in all of the periodontal parameters, such as plaque index, bleeding during catheterization, depth of the sulcus, and rate of gingival growth. Remission of gingival hyperplasia continued until three months after the dentifrice stopped being used, suggesting, therefore, a safe and effective therapeutic alternative, with no negative side effects. However the continuous use of this dentifrice contained antibiotic is not recommended, because it changes the oral microflora, predisposing the development of opportunistic infections.

There is evidence that CsA plays a role in modulating fibroblastic activity; however, this has not yet been elucidated. Various studies have demonstrated abnormally elevated levels of specific cytokines in hyperplastic gingival tissue. These findings are of great importance and suggest that the substances that cause GO can alter the normal balance of cytokines in gingival tissues, enhances levels of cytokines. These substances include: IL-6, IL-1 β , PDGF-B, FGF-₂, CTGF, TGF- β ².¹⁴. Wrigth et al¹⁵ observed elevated levels of TGF- β ₁ in crevicular fluid in patients with gingival overgrowth who used cyclosporine, in comparison with the control group which did not use medication.

The transforming- growth factor (TGF- β) is a multifunctional inflammatory mediator that regulates the proliferation, differentiation, death of cells and apoptosis. It also directly activates gene expression for synthesis of components of the extracellular matrix, especially collagen, besides the inhibitory effects of matrix degradation, reduced synthesis of proteases and increase in the levels of protease inhibitors¹⁶. It induces an increase in the expression of collagens types I, III, VI, VII and X, fibronectin and proteoglycans. In addition to this, it strongly regulates MMP-

13, a more restricted collagenase to hydrolyze the collagen in human gingival fibroblasts¹⁷. It has several anti-inflammatory properties and it exerts its anti-inflammatory actions via inhibiting mitogenesis and cytokine responses of glomerular cells and suppressing function of infiltrating cells. This cytokine is implied in the pathogenesis of various fibrotic conditions, such as: glomerulonephritis, scleroderma, keloid formation in drug-induced and non-drug-induced renal fibrosis and in cardiac insufficiency (heart failure)¹⁵.

Recently, it was reported that erythromycin ameliorates renal injury in streptococci-induced diabetic rats and erythromycin reduced TGF- β gene expression, type IV collagen production and NF- κ B activity in renal tissues¹⁸. It is possible that roxithromycin inhibited TGF- β production via the inhibition of NF- κ B activation⁸.

Therefore, due to the evidence in the literature, it is possible that TGF- β has an important role in cyclosporine-induced gingival overgrowth. In the present study we observed that roxithromycin treatment reduced gingival overgrowth in renal transplant patients, but the mechanism of action was not completely understood. However, the inhibition of TGF- β by macrolide antibiotic in culture human mesangial cells was demonstrated⁸. It is possible that the effect of roxithromycin on gingival overgrowth in renal transplant patients may be modulated by the inhibition of TGF- β production in gingival tissues, but further studies must be performed to investigate this hypothesis.

REFERENCES

1 - Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med.* 1989; 321: 1725-1738.

- 2 - Yoshida T, Nagata J, Yamane A. Growth factors and proliferation of cultured rat gingival cells in response to cyclosporin A. *J Periodont Res.* 2005; 40: 11-19.
- 3 - Saito K, Mori S, Iwakura M et al. Immunohistochemical localization of transforming growth factor b, basic fibroblast growth factor and heparan sulphate glycosaminoglycan in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. *J Periodont Res.* 1996; 31: 545-555.
- 4 - Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. The cell biology of transforming growth factor- β *Biochim Biophys Acta.* 1990; 1032: 79-87.
- 5 - Gómez E, Sánchez-Nuñez M, Sánchez JE et al. Treatment of cyclosporin-induced gingival hyperplasia with azithromycin. *Nephrol Dial Transplant.* 1997; 12: 2694-2697.
- 6 - Citterio F, DI Pinto MT, Borzi MC et al. Azithromycin treatment of gingival hyperplasia in kidney transplant recipients is effective and safe. *Transplant Proc.* 2001; 33: 2134-2135.
- 7 - Tokgoz B, Sari HI, Yildiz O et al. Effects of azithromycin on cyclosporine-induced gingival hyperplasia in renal transplant patients. *Transplant Proc.* 2004; 36(9): 2699-2702.
- 8 - Yamabe H, Shimada, M, Kaizuka M et al. Roxithromycin inhibits transforming growth factor- β production by cultured human mesangial cells. *Nephrology.* 2006; 11: 524-530.
- 9 - Wondimu B, Nemeth A, Modeer T. Oral health in liver transplant children administered cyclosporin A or tacrolimus. *Int J Paediatr Dent.* 2001; 11(6): 424-9.
- 10 - Newell J, Irwin CR. Comparative effects of cyclosporin on glycosaminoglycan synthesis by gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 1997; 68: 443-447.
- 11 - Spratt H, Boomer S, Irwin CR et al. Cyclosporine associated gingival overgrowth in renal transplant recipients. *Oral Diseas.* 1999; 5: 27-31.
- 12 - Nash MM, Zaltzman JS. Efficacy of azithromycin in the treatment of cyclosporin-induced gingival hyperplasia among renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 1998; 30: 2117-2119.
- 13 - Argani H, Pourabbas R, Hassanzadeh D. Treatment of Cyclosporine-induced gingival overgrowth with Azithromycin-containing toothpaste. *Experimental and Clinical Transplantation.* 2006; 4 (1): 420-424.
- 14 - Spolidorio LC, Holzhausen M, Spolidorio DMP et al. Cyclosporin but not tacrolimus significantly increases salivary cytokine contents in rats. *J Periodontol.* 2005; 76: 1520-1525.

15 - Wright H J, Chapple ILC, Matthews JB. TGF- β isoforms and TGF- β receptors in drug-induced gingival and hereditary gingival overgrowth. *J Oral Pathol.* 2001; 30: 281-289.

16 - Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by members of the transforming growth factor- β superfamily. *Cytokine Growth Rev.* 1996; 7: 327-339.

17 - Massague J. The transforming growth factor- β family. *Ann Rev Cell Biol.* 1990; 6: 597-641.

18 - Tone A, Shikata K, Sasaki M et al. Erythromycin ameliorates renal injury via anti-inflammatory effects in experimental diabetic rats. *Diabetologia.* 2005; 48:2402-2411.

**DOWN-REGULATION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β 2
EXPRESSION IS ASSOCIATED WITH THE REDUCTION OF**

CYCLOSPORIN-INDUCED GINGIVAL OVERGROWTH IN RATS TREATED WITH ROXITHROMYCIN

Simone Aparecida Probst **CONDÉ**¹, Marcus Gomes **BASTOS**², Beatriz Julião **VIEIRA**³, Ivo Martins **MALTA**⁴, Luciana Valente **BORGES**⁵, Fernando Monteiro **AARESTRUP**⁶

1 Post-graduate Program in Brazilian Health, Federal University of Juiz de Fora/UFJF.

2 Department of Nefrology, NIEPEN Institute, IMEPEN Foundation, Federal University of Juiz de Fora/UFJF.

3 Laboratory of Immunopathology and Experimental Pathology, Federal University of Juiz de Fora. PhD in Pathology from Fluminense Federal University/UFF.

4 Farmacista/Biochemist

5 Laboratory of Immunopathology and Experimental Pathology, Federal University of Juiz de Fora - UFJF; Ph.D. in Pathology from the Universidade Federal Fluminense - UFF - Niterói (RJ), Brazil

6 Laboratory of Immunopathology and Experimental Pathology, Federal University of Juiz de Fora - UFJF; Ph.D. in Pathology from the Universidade Federal Fluminense - UFF - Niterói (RJ), Brazil

Correspondence: S.A.P. Condé, Programa de Pós-graduação em Saúde Brasileira/UFJF, Campus da UFJF, bairro Martelos, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil. E-mail: simoneprobst@ibest.com.br

Abstract

BACKGROUND: Gingival overgrowth (GO) is a common side effect of the chronic use of cyclosporine (CsA), an immunosuppressant widely used to prevent rejection in transplant patients. Recent studies have reported elevated levels of specific cytokines in hyperplastic gingival tissue, particularly TGF- β , suggesting that this growth factor plays a role in the accumulation of extracellular matrix materials. The effectiveness of azithromycin, a macrolide antibiotic, in the regression of this undesirable side effect has also been demonstrated. **METHODS:** In this study, we created an experimental model for assessing the therapeutic effect of roxithromycin in GO and the expression of transforming growth factor beta (TGF- β 2) through immunohistochemistry. We used four groups of mice totaling 32 individuals. GO was induced during five weeks and drug treatment was given on the 6th week as follows: group 1 received saline; group 2 received CsA and was treated with saline on the 6th week; group 3 received CsA and, on the 6th week, ampicilin; and group 4 received CsA during 5 weeks and, on the 6th week, was treated with roxithromycin. **RESULTS:** The results demonstrated that roxithromycin treatment was effective in reducing cyclosporine-induced GO in rats. Both epithelial and connective tissue showed a decrease in thickness and a significant reduction in TGF- β 2 expression, with a lower number of fibroblasts, reduction in fibrotic areas and decrease in inflammatory infiltrate. **CONCLUSION:** The present data suggest that the down-regulation of TGF- β 2 expression may be an important mechanism of action by which roxithromycin inhibits GO.

Keywords: cyclosporine; gingival overgrowth; roxithromycin; TGF- β 2.

INTRODUCTION

Cyclosporine (CsA) has been widely used to prevent organ transplant rejection and to treat various immunodiseases (DALEY & WYSOCKI, 1984). It selectively suppresses helper T-cell function and modulates the network of inflammatory cytokines. However, CsA is associated with several adverse side effects, such as nephrotoxicity, hepatotoxicity, hirsutism and gingival overgrowth (GO) (RATEITSCHAK-PLUSS et al., 1983; KAHAN, 1989; SEYMOUR et al., 1992).

The average prevalence of dentate transplant patients who develop cyclosporine induced GO is around 30%, with variation between 10 and 85% (WYSOCKI, 1983; DALEY, 1986; SEYMOUR, 1987; WONDIMU, 1993; ALLMAN, 1994). When associated with other medication, such as calcium channel blocker antihypertensives, this prevalence increases, as does the gravity of the complication, and, consequently, the risk (THOMASON, 1993; BÖKENKAMP, 1994; O'VALLE, 1995; MARGIOTTA, 1996).

Fibrosis, a common finding in GO, is the result of a variety of biochemical signals from many cell types including inflammatory cells and fibroblasts, which stimulate fibroblast proliferation and extracellular matrix production. The transforming growth factor beta (TGF- β) is a multifunctional family of cytokines present in this pathway. There are three mammalian isoforms of TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3), which are structurally identical (IHN, 2002). Increased TGF- β 1 levels have been associated in cyclosporin-induced renal fibrosis. Elevated gingival TGF- β 1 and TGF- β 2 expression has been observed by immunohistochemical studies (SAITO et al., 1996; WRIGHT et al., 2001). TGF- β 2 is an immunosuppressive cytokine modulated

by cyclosporine that plays a central role during the formation of fibrosis and inflammatory reaction (SMITH et al., 2000; SAIKA et al., 2006; MAIER et al., 2006).

Recently, it was demonstrated that roxithromycin has an inhibitory effect on the production of TGF- β by human mesangial cells, and may be efficient in the treatment of glomerulosclerosis (YAMABE et al. 2006). Therefore, this macrolide antibiotic may be a therapeutic alternative in the treatment of gingival overgrowth. In the present study we investigated the effect of roxithromycin on GO in rats treated with cyclosporine. Our findings indicate that roxithromycin reduces GO and down-regulates TGF- β 2 expression in gingival tissues.

MATERIAL AND METHODS

Thirty-two 6-week-old male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), weighing 100 to 150 mg were randomly selected and divided equally into four groups of eight animals each. The control rats (group 1) were daily injected subcutaneously with saline. The experimental rats (group 2) were treated with CsA injected subcutaneously in a daily dose of 10 mg/kg for six weeks and, at the beginning of the 6th week, they were injected subcutaneously with saline. Group 3 was similar to group 2, but in the last week it was treated with 50 mg/kg ampicillin (an antibiotic widely used in periodontal infections) via gastric feeding. In group 4, the animals received CsA daily for 6 weeks and in the last week they were treated with 40mg/kg roxithromycin by gastric feeding. The rats were weighed weekly and the dosage was adjusted accordingly. Diet and drinking water were given *ad libitum* during the experiment.

Macroscopy analysis

At the end of the experimental period, all the animals were sacrificed by means of an overdose of anesthesia. To investigate gingival alterations over time, stone models were made from silicone impressions of the maxillary anterior region. The buccal-lingual width and mesio-distal width of the anterior segment of the maxilla were measured using a digital caliper.

Histopathology and histomorphometry

All gingival samples obtained were fixed in 10% buffered formalin (pH 7) for at least 24 hours. After fixation, the samples were gradually dehydrated in increasing concentrations of ethanol (70% to 100%), cleared in xylene, soaked and embedded in paraffin, according to routine histological methods.

The paraffin-embedded fragments were cut with an “820” Spence microtome and 4 μm thick sections were obtained. The histological slides were kept in an incubator to dry, and then the sections were stained with hematoxylin and eosin for histological analysis. Histomorphometry was performed using images captured and evaluated by a computerized Axion Vision (Zeiss, Berlin, Germany) image capture system. Images were captured from four randomly chosen microscopic fields for each histological slide, using the digital camera (400X and 100X magnification) of an Axiostar Plus microscope (Zeiss, Berlin, Germany).

The images were stored and submitted to a count of inflammatory cells and of all fibroblast-like cells. Linear measurements were made to obtain the higher diameter of epithelial and gingival connective tissue, using digital marking.

Immunohistochemistry

Paraffin sections (4 μm of thick) of formalin-fixed tissue were obtained at varying depths from each tissue block. The presence of TGF- β 2 enzyme in the gingival samples was investigated in paraffin sections by using the avidin-biotin-peroxidase complex procedure (ABC) with an additional step for antigen retrieval with a retrieval solution (Dakopatts, Copenhagen, Denmark). In brief, the sections were incubated with

polyclonal rabbit anti-TGF- β 2 antibody diluted 1/20 and incubated for one hour at room temperature (Santa Cruz, Santa Cruz, USA) followed by a goat anti-rabbit IgG biotinylated antibody (Dakopatts, Copenhagen, Denmark). Controls for the ABC procedure were performed by replacing anti-TGF- β 2 antibody with normal rabbit serum, or by omitting the anti-TGF- β 2 antibody. The sections were analyzed via light microscopy, and photomicrographs were taken with an Axiostar Zeiss microscope (Zeiss, Germany). The number of the TGF- β 2 immunoreactive cells by microscopic field (400 X magnification) was counted in connective tissue.

Statistical analysis

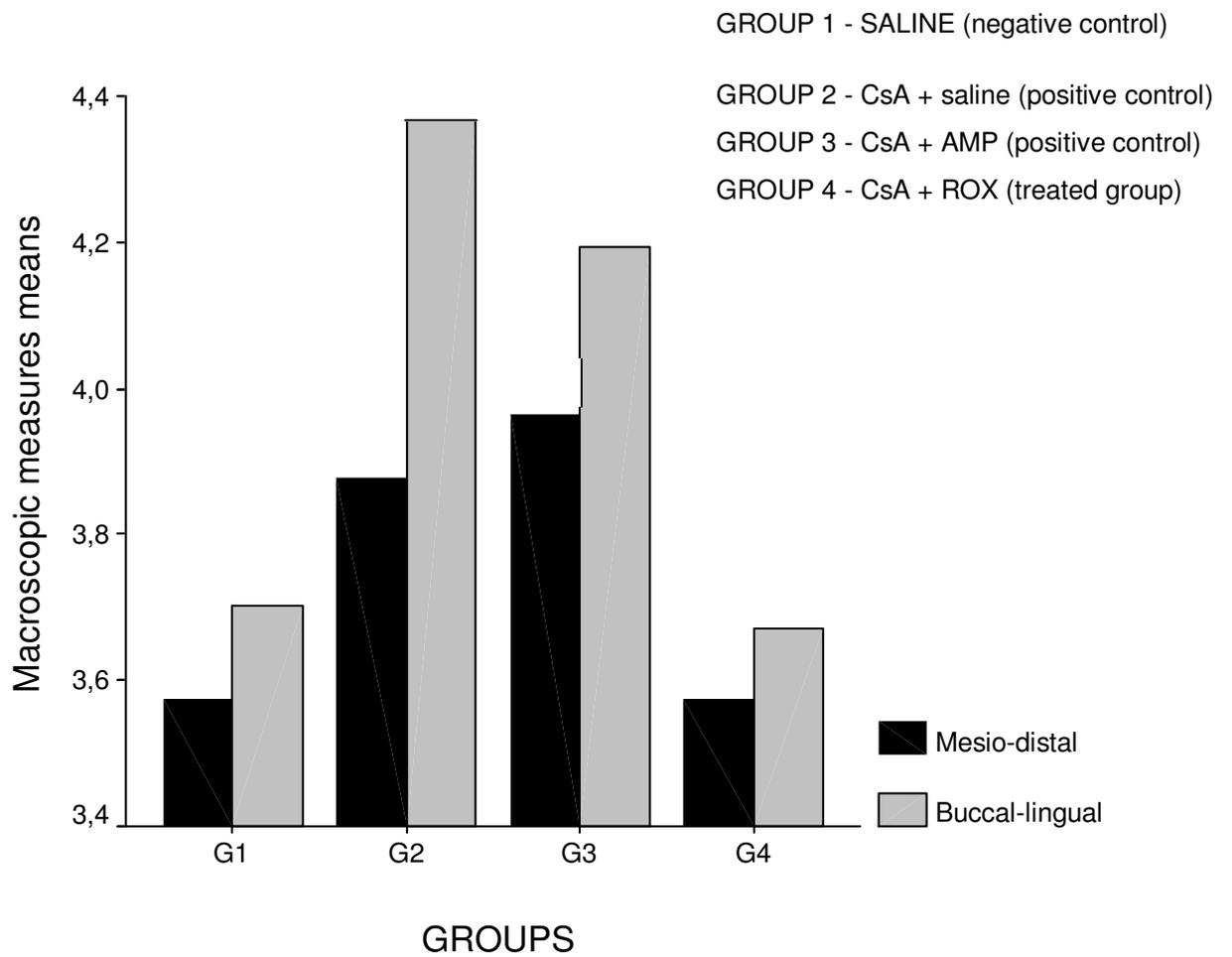
Data were expressed as means and standard deviation. ANOVA was used for statistical evaluation. The gingival mucosa width, the number of inflammatory cells, all fibroblast-like cells and TGF- β 2 immunoreactive cells were compared between groups by using the Student's *t*-test. The significance level adopted was $p < 0.05$.

RESULTS

All cyclosporine treated rats presented GO that was evident in all gingival localizations. Graphic 1 shows macroscopic measurements of the buccal-lingual width and mesio-distal width. The macroscopic analysis revealed a significant reduction of the buccal-lingual width and mesio-distal width in the roxithromycin treated rats (group 4) when compared with group 2 and group 3 (graphic 1). The histopathological analysis revealed that GO was a result of the enlargement of epithelial and connective tissues (figures 1A, 1B, 1C, 1D). No fibrotic areas were observed in gingival samples from group 1 (negative control group). Extensive fibrosis is a common finding in gingival samples from groups 2 and 3, however a few number of fibrotic areas were observed in gingival tissue of roxithromycin treated rats (figures 2A, 2B, 2C, 2D). Diameter measurements of the epithelial and connective tissues were obtained (graphic 2). The measurements observed in roxithromycin treated rats (group 4) were statistically lower than those observed in the GO positive control groups (group 2 and group 3). The histomorphometric analysis also demonstrated that the animals treated with roxithromycin presented a lower number of fibroblasts per microscopic field (graphic 3). The identification of fibroblasts, based on morphological criteria, was made by two different researchers. Finally, a lower number of inflammatory cells was observed in gingival samples obtained from roxithromycin treated group when compared with group 2 and group 3 (graphic 4).

Cytoplasmatic staining for TGF- β 2 was detected in most cell types of the connective tissue. TGF- β 2 was expressed within connective tissue by inflammatory cells, fibroblasts and endothelial cells (figures 3A, 3B, and 3C). Most of the fibroblasts

and endothelial cells were TGF- β 2 positive and showed a variable staining pattern, usually weakly or darkly positive. Immunohistochemical analysis showed a lower number of TGF- β 2 positive cells (graphic 5) – recognized morphologically as fibroblasts, endothelial cells and inflammatory cells in the connective tissue samples from roxithromycin treated rats when compared with GO positive controls rats (group 2, and group 3). No significant differences were detected when compared to the number of TGF- β 2 positive cells in gingival samples obtained from group 1 and group 4 (graphic 5).



Graphic 01 – Macroscopic measurements of bucco-lingual and mesio-distal maxillary regions. Results expressed as mean ($p < 0.05$).

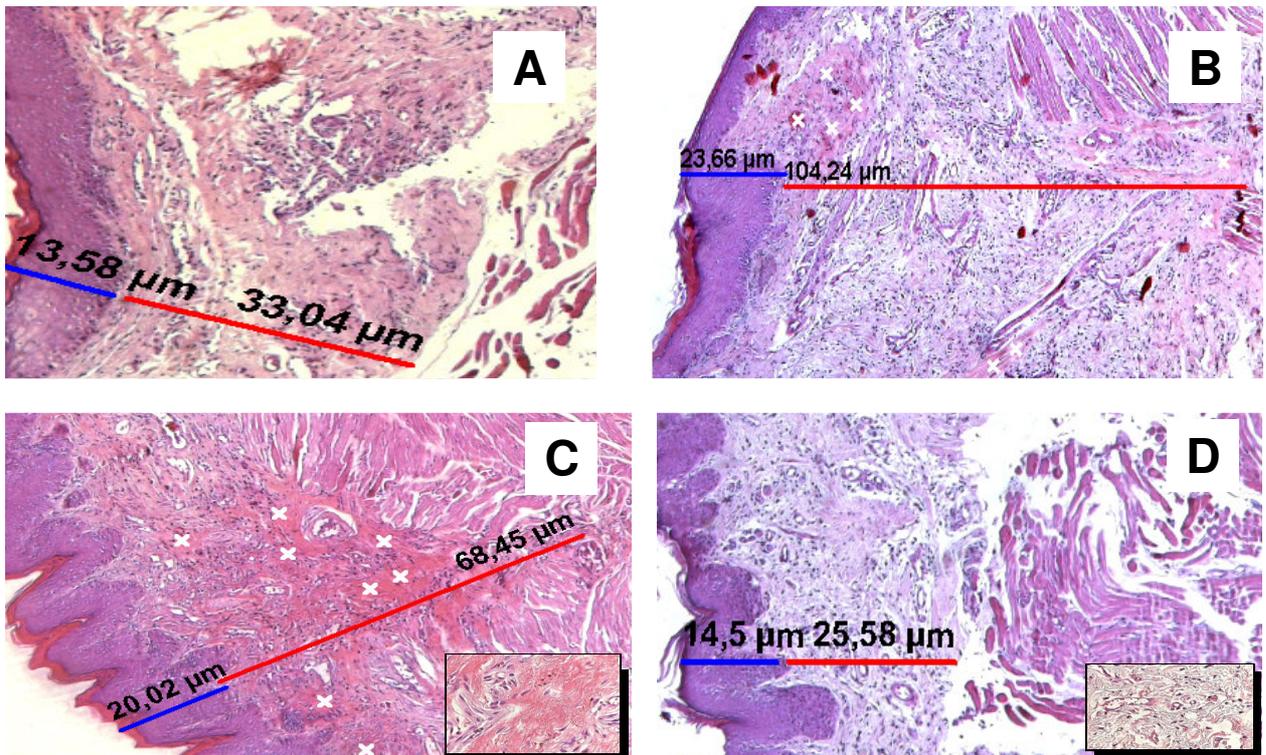


Fig. 01 – Gingival mucosa measurement (μm) in the region with greater epithelial and connective tissue thickness. A – D: Smaller thickness of gingival mucosa (groups 1 and 4). B – C: Greater thickness of gingival mucosa (groups 2 and 3). In detail: difference in the fibrotic areas in groups 3 and 4. x – fibrosis. Original magnification 100x.

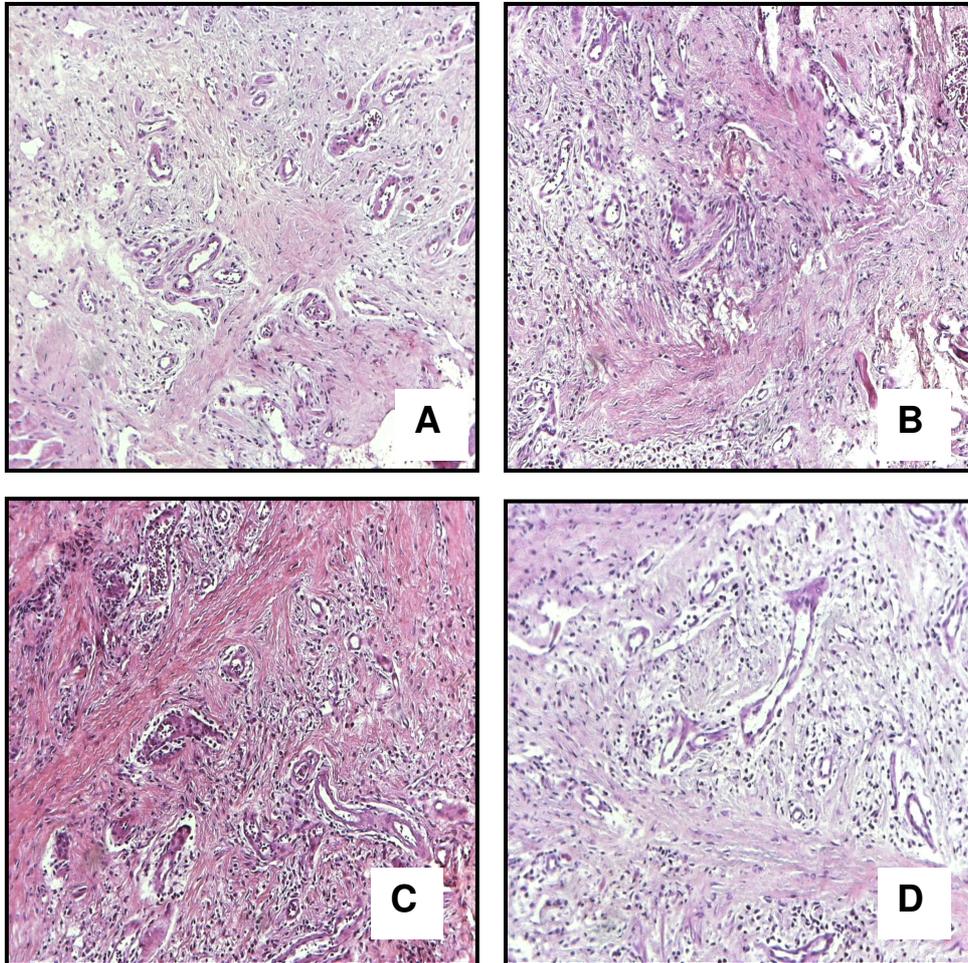
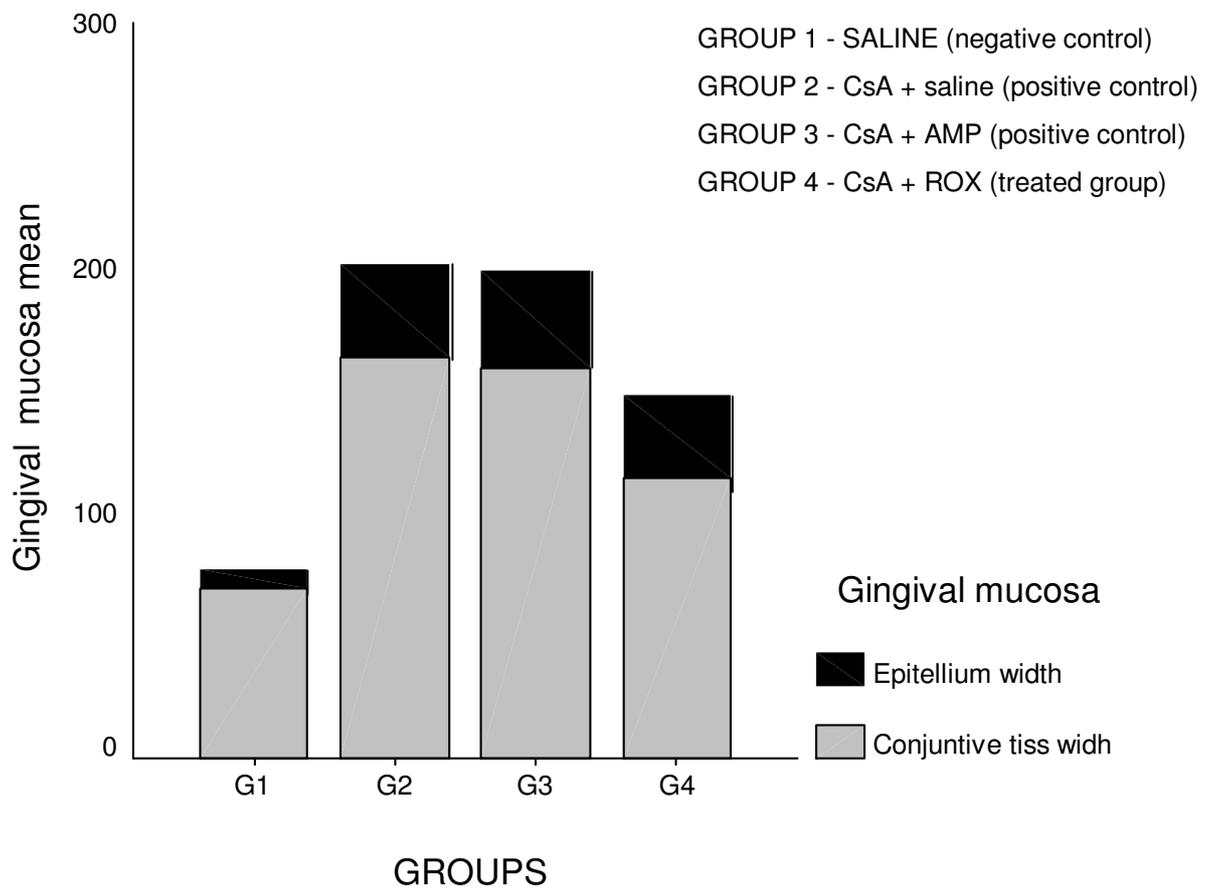
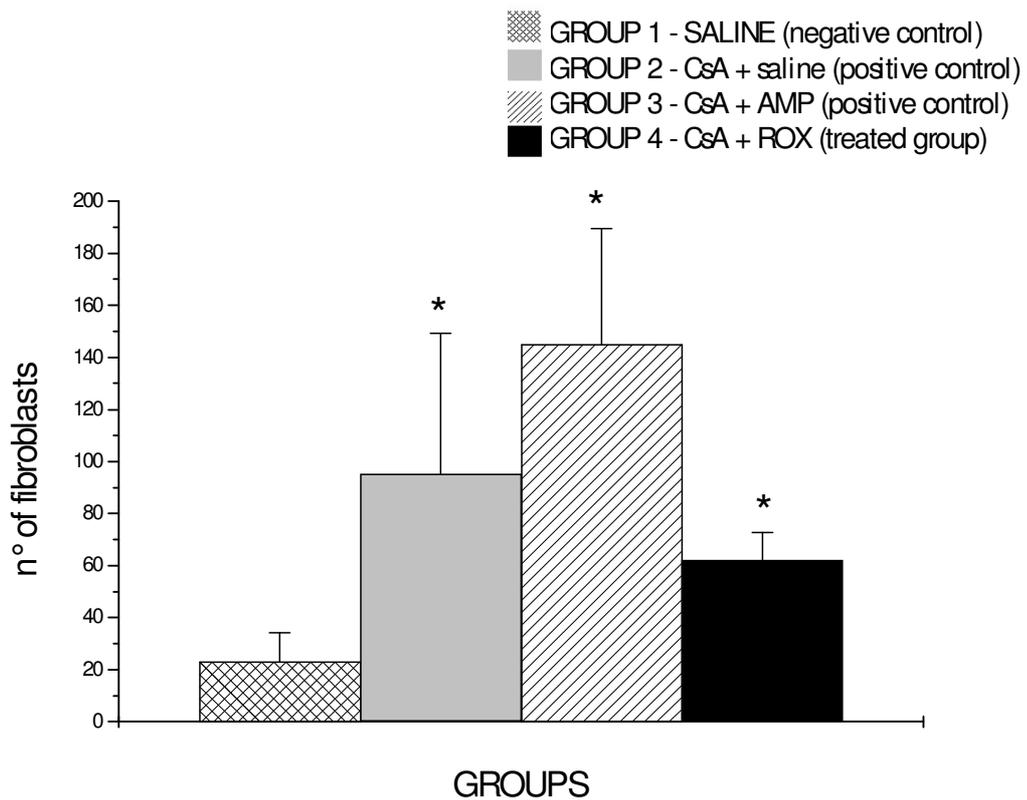


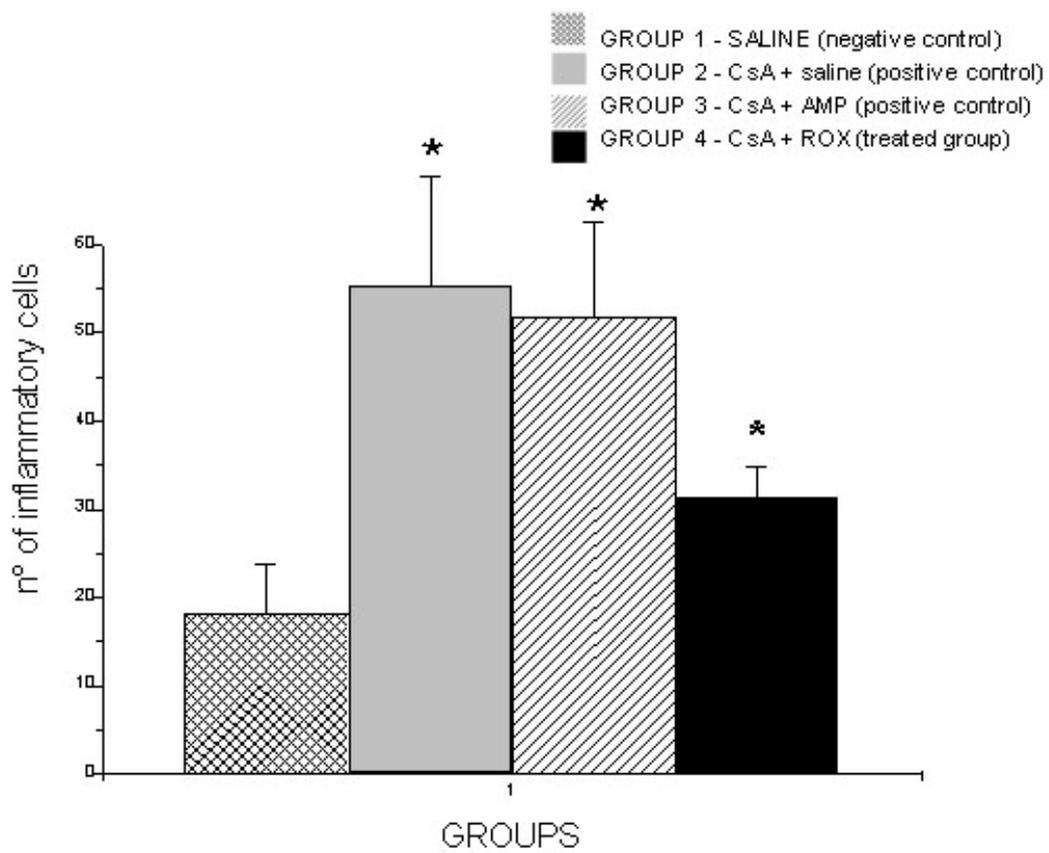
Fig. 02. A: Normal connective tissue in group 1 (negative control); B-C: Extensive fibrosis in groups 2 and 3 (positive controls); D: Few areas with fibrosis in group 4 (treated group). Original magnification 400x.



Graphic 02 – Measurements of gingival mucosa (epithelium and lamina propria). Results expressed as mean ($p < 0.05$).



Graphic 03 – Number of fibroblasts per microscopic field. Results expressed as mean \pm SD ($p < 0.05$).



Graphic 04 – Number of inflammatory cell per microscopic field. Results expressed as mean \pm SD ($p < 0.05$).

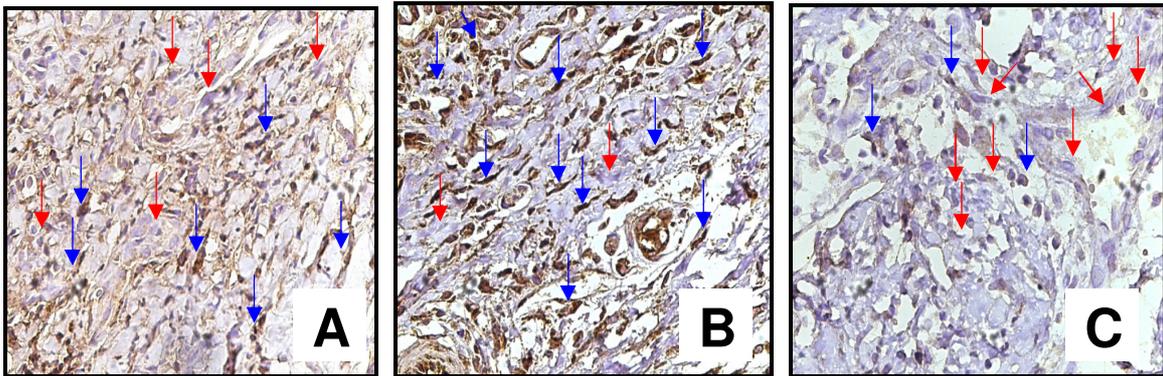
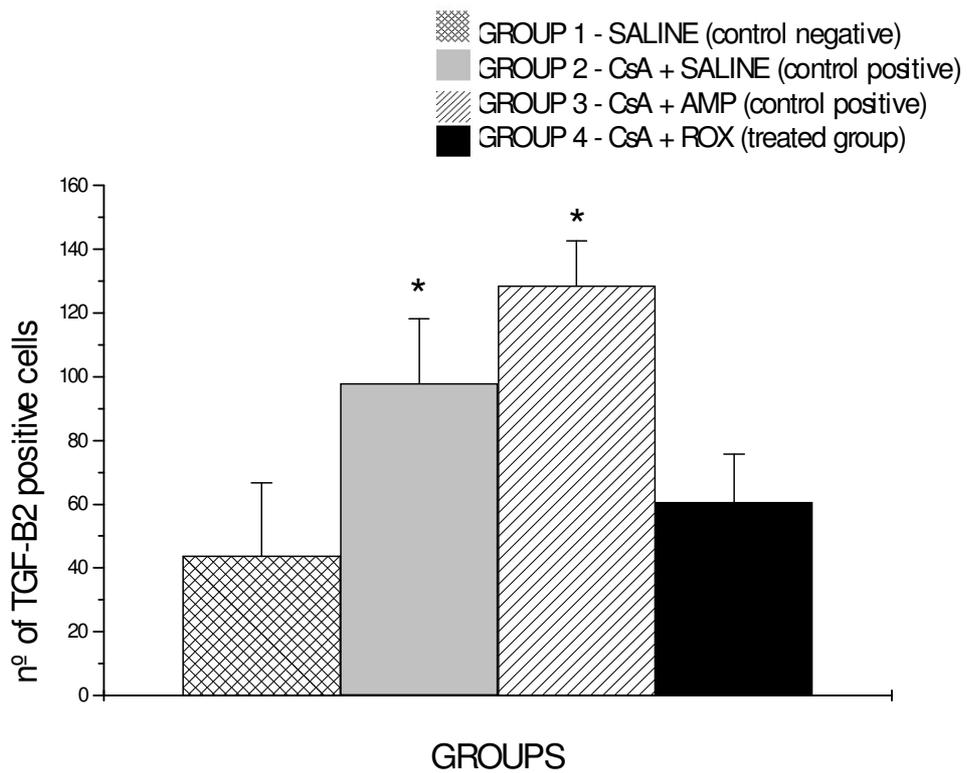


Fig. 3. A-B: Elevated expression of TGF- β 2 in cells of connective tissue (groups 2 and 3); C: Light TGF- β 2 stained cells in group 4. Red arrows - negative staining cells. Blue arrows: positive staining cells. Original magnification 400x.



Graphic 05 - Number of positive staining cell of TGF-β2 in connective tissue per microscopic field. Results expressed as mean ± SD (p < 0.05).

DISCUSSION

Cyclosporine (CsA) is a hydrophobic neutral cyclic polypeptide composed of eleven amino acids and made from the fungus *Tolypocladium inflatum gams*. It specifically acts in suppressing the immune response mediated by T cells. It goes through biotransformation in the liver, resulting in 14 metabolic products, of which 90% is excreted in feces and 10% eliminated by the kidneys (SEYMOUR, THOMASON, ELLIS, 1996).

Gingival overgrowth is one of the side effects caused by the chronic use of cyclosporine (CsA), which is employed to prevent rejection of transplanted organs and to treat several autoimmune diseases, such as diabetes mellitus, Behcet's disease, psoriasis, multiple sclerosis, erosive lichen planus, systemic lupus erythematosus, bullous pemphigoid, rheumatoid arthritis, myasthenia gravis, uveitis, and various glomerulopathies (KAHAN, 1989; DE MATTOS, 1996; YOSHIDA, 2005).

GO treatment includes removing bacterial plaque, maintaining adequate oral hygiene, and also includes invasive procedures, such as gingivectomy. Treatment for this complication, until recently, was only surgical. Nowadays, several studies have been conducted to determine the effect of antibiotic treatment on the regression of gingival overgrowth. In 1995, Wahlstrom, Zamora and Teichmann coincidentally used azithromycin – a semi synthetic antibiotic, derived from the macrolide erythromycin – to treat respiratory infections in two renal transplant patients who had cyclosporine-induced GO. They observed gingival reduction after using it. The daily treatment with 300 mg for five days is simple, cheap, conservative, quickly effective, and avoids gingival surgery. It acts mostly against gram-positive and negative bacteria, has quick

oral absorption, does not alter serum levels of cyclosporine or levels of creatinine. Azithromycin is well tolerated, but can produce side effects, such as diarrhea, abdominal pain, nausea and vomiting (GÓMEZ, 1997; WIRNSBERGER et al., 1998; CITTERIO, 2001; KWUN, 2003; TOKGOZ, 2004; CHAND, 2004).

Several studies have demonstrated elevated levels of specific cytokines in hyperplastic gingival tissue, especially TGF- β , which suggests that this growth factor plays a role in the accumulation of the extracellular matrix (JAMES, IRWIN, LINDEN, 1998; RUHL et al., 2004; YOSHIDA, NAGATA, YAMANE, 2005). Recently, we used roxithromycin in four renal transplanted patients (in press) and the results suggest that roxithromycin may be an important therapeutic tool used to reduce cyclosporine-induced GO.

Yamabe et al. (2006) suggested that the use of roxithromycin has an inhibitory effect on the production of TGF- β by human mesangial cells, and can be efficient in the treatment of glomerulosclerosis. The mechanisms that roxithromycin inhibited TGF- β production are not clear, but in this study the drug did not inhibit the activation of tyrosine kinase and MAP kinase by thrombin. Roxithromycin suppressed the thrombin-induced translocation of NF- κ B p65 protein into the nucleus. It is suggested that the activation of NF- κ B regulates TGF- β production, thus ROX inhibited TGF- β production via the inhibition of NF- κ B.

An immunohistochemical study has suggested that TGF- β expression is increased in gingival overgrowth induced by the drugs nifedipine and phenytoin compared with control tissue (SAITO, 1996). Studies have shown that TGF- β is a multifunctional inflammatory mediator. It has a role in regulating cell proliferation and differentiation as well as in directly activating gene expression for the synthesis of

extracellular matrix components including collagenous proteins (ROBERTS, 1983; BARNARD, 1990).

In the present study, the results demonstrated that roxithromycin treatment was effective to reduce cyclosporine-induced GO in rats. Both epithelial and connective tissues showed a decrease in thickness in roxithromycin treated rats in comparison with animals from the control groups. In addition, the significant reduction in TGF- β 2 expression in roxithromycin treated rats was associated with a lower number of fibroblasts, with reduction of fibrotic areas and decrease in inflammatory infiltrate. Taken together, our data suggest that the down-regulation of TGF- β 2 expression may be an important mechanism of action by which roxithromycin inhibits GO.

REFERENCES

- ALLMAN, S.D.; McWHORTER, A.G.; SEALE, N.S. Evaluation of cyclosporine induced gingival overgrowth in the pediatric transplant patient. **Pediatr Dent** 16: 36-40, 1994.
- BARNARD, J.Á.; LYONS, R.M.; MOSES, H.L. The cell biology of transforming growth factor- β **Biochim Biophys Acta** 1032: 79-87, 1990.
- BÖKENKAMP, A.; BOHNHORST, B.; BEIER, C. et al. Nifedipine aggravates cyclosporine-A induced gingival hyperplasia. **Pediatr Nephrol** 8: 181-185, 1994.
- CHAND, D.H.; QUATTROCCHI, J.; POE, S.A. et al. Trial of metronidazole vs. azithromycin for treatment of cyclosporine-induced gingival overgrowth. **Pediatr Transplant** 8: 60-64, 2004.
- CITTERIO, F.; DI PINTO, M.T.; BORZI, M.C. et al. Azithromycin treatment of gingival hyperplasia in kidney transplant recipients is effective and safe. **Transplant Proc** 33: 2134-2135, 2001
- DALEY, T.D.; WYSOCKI, G.P. Cyclosporin therapy. **J Periodontol** 55: 708-712, 1984.
- DALEY, T.D.; WYSOCKI, G.P.; DAY, C. Clinical and pharmacologic correlations in cyclosporine-induced gingival hyperplasia. **Oral Surg Oral Med Oral Path** 62: 417-421, 1986
- DE MATTOS, A.M.; OLYAEI, A.J.; BENNETT, W. M. Pharmacology of immunosuppressive medications used in renal diseases and transplantation. **Am J Kidney Dis** 28: 631-667, 1996.
- GÓMEZ, E.; SÁNCHEZ-NUÑES, M.; SÁNCHEZ, J.E. et al. Treatment of cyclosporin-induced gingival hyperplasia with azithromycin. **Nephrol Dial Transplant** 12: 2694-2697, 1997.
- IHN H. Pathogenesis of fibrosis: Role of TGF- β and CTGF. **Curr Opin Rheumatol** 14: 681-685, 2002.
- JAMES, J.A.; IRWIN, C.R.; LINDEN, G.J. Gingival fibroblast response to cyclosporin A and transforming growth factor beta 1. **J Periodontol Res** 33: 40-48, 1998.
- KAHAN, B.D. Cyclosporine. **N Engl J Med** 321: 1725-1738, 1989.
- KWUN, W.H.; SUH, B.Y.; KWUN, K.B. Effect of azithromycin in the treatment of cyclosporine-induced gingival hyperplasia in renal transplant recipients. **Transplant Proc** 35(1): 311-312, 2003.

MAIER, P.; BROSZINSKI, A.; HEIZNANN, U et al. Determination of active TGF- β 2 in aqueous humor prior to and following cryopreservation. **Molecular Vision** 12: 1477-1482, 2006.

MARGIOTTA, V.; PIZZO, I.; PIZZO, G. et al. Cyclosporin-and nifedipine-induced gingival overgrowth in renal transplant patients: correlations with periodontal and pharmacological parameters, and HLA- antigens. **J Oral Pathol Med** 25: 128-134, 1996.

O'VALLE, F.; MESA, F.; ANEIROS, J. et al. Gingival overgrowth induced by nifedipine and cyclosporin A. **J Clin Periodontol** 22: 591-597, 1995.

RATEITSCHAK-PLUSS, E.M.; HEFTI, A.; LOERTSCHER, R. et al. Initial observation that cyclosporine-A induces gingival enlargement in man. **J Clin Periodontol** 10: 237-246, 1983.

ROBERTS, A.B.; ANZANO, M.A.; MEYERS, C.A. et al. Purification and properties of a type β transforming growth factor from bovine kidney. **Biochemistry** 22: 5692-5698, 1983.

RUHL, S.; HAMBERGER, S.; BETZ, R. et al. Salivary proteins and cytokines in drug-induced gingival overgrowth. **J Dent Res** 83(4): 322-326, 2004.

SAIKA, S. TGF-beta pathobiology in the eye. **Lab Invest** 86(2):106-115, 2006.

SAITO, K.; MORI, S.; IWAKURA, M. et al. Immunohistochemical localization of transforming growth factor β , basic fibroblast growth factor and heparan sulphate glycosaminoglycan in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. **J Periodont Res** 31: 545-555, 1996.

SEYMOUR, R.A.; SMITH, D.G.; ROGERS, S.R. The comparative effect of azathioprine and cyclosporin on some gingival health parameters of renal transplant patients. **J Clin Periodontol** 14: 610-613, 1987.

SEYMOUR, R.A.; JACOBS, D.J. Cyclosporin and the gingival tissues. **J Clin Periodontol** 19: 1-11, 1992.

SEYMOUR, R.A.; THOMASON, J.M.; ELLIS, J.S. The pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. **J Clin Periodontol** 23: 165-175, 1996.

SMITH, P.D.; POLO, M.; SOLER, P.M. et al. Efficacy of growth factors in the accelerated closure of interstices in explanted meshed human skin grafts. **J Burn Care Rehabil** 21: 5-9, 2000.

THOMASON, J.M.; SEYMOUR, R.A.; RICE, N. Prevalence and severity of cyclosporine and nifedipine.-induced gingival overgrowth. **J Clin Periodontol** 20: 37-40, 1993.

TOKGOZ, B.; SARI, H.I.; YILDIZ, O. et al. Effects of azithromycin on cyclosporine-induced gingival hyperplasia in renal transplant patients. **Transplant Proc** 36(9): 2699-2702, 2004.

WAHLSTROM, E.; ZAMORA, J. V.; TEICHMAN, S. Improvement in cyclosporine associated gingival hiperplasia with azithromycin therapy. **N Engl J Med** 332-353, 1995.

WIRNSBERGER, G.H.; PFRAGNER, R.; MAURIC, A. et al. Effect of antibiotic treatment azithromycin on cyclosporine A-induced gingival hyperplasia among renal transplant recipients. **Transplant Proc** 30: 2117-2119, 1998.

WISOCKI, G.P.; GRETZINGER, H.A.; LAUPACIS, A. et al. Fibrous hyperplasia of gingival: a side effect of cyclosporin-A therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 55: 274-278, 1983.

WONDIMU, B.; DAHLLOF, G.; BERG, U. et al. Cyclosporine-A induced gingival overgrowth in renal transplant children. **Scand J Dent Res** 101: 282-286, 1993.

WRIGHT, H. J.; CHAPPLE, I. L. C.; MATTHEWS, J.B. TGF- β isoforms and TGF- β receptors in drug-induced gingival and hereditary gingival overgrowth. **J Oral Pathol** 30: 281-289, 2001.

YAMABE, H.; SHIMADA, M.; KAIZUKA, M. et al. Roxithromycin inhibits transforming growth factor- β production by cultured human mesangial cells. **Nephrology** 11: 524-530, 2006.

YOSHIDA, T.; NAGATA, J.; YAMANE, A. Growth factors and proliferation of cultured rat gingival cells in response to cyclosporin A. **J Periodont Res** 40: 11-19, 2005.

5 – COMENTÁRIOS FINAIS

O trabalho intitulado “Avaliação da roxitromicina na regressão da hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina em ratos”, referente a dissertação de mestrado supra-citado, foi aprovado para apresentação na 24^a Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica que acontecerá entre os dias 02 a 04 de setembro de 2007, na cidade de Atibaia, no estado de São Paulo.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, S.S.; SHRIVASTAV, S.; DANIELPOUR, D. et al. Regulation of transforming growth factor-beta 1 and its receptor by cyclosporine in human T lymphocytes. **Transplant** 60: 718-723, 1995.

ALLMAN, S.D.; McWHORTER, A.G.; SEALE, N.S. Evaluation of cyclosporine induced gingival overgrowth in the pediatric transplant patient. **Pediatr Dent** 16: 36-40, 1994.

ARGANI, H.; POURABBAS, R.; HASSANZADEH, D. Treatment of Cyclosporine-induced gingival overgrowth with Azithromycin-containing toothpaste. **Exp Clin Transplant**, 4 (1): 420-424, 2006

ARORA, P.D.; SILVESTRI, L.; GANSS, B. et al. Mechanism of cyclosporin-induced inhibition of intracellular collagen degradation. **J Biol Chem** 276: 14100-14109, 2001.

ATTISANO, L. & WRANA, J.L. Signal transduction by members of the transforming growth factor- β superfamily. **Cytokine Growth Rev** 7: 327-339, 1996.

BARNARD, J.Á.; LYONS, R.M.; MOSES, H.L. The cell biology of transforming growth factor- β **Biochim Biophys Acta** 1032: 79-87, 1990.

BARTOLD, P.M. Regulation of human gingival fibroblast growth and synthetic activity by cyclosporin-A in vitro. **J.Periodon Res** 24: 314-321, 1989.

BIRRAUX, J.; KIRBY, J.A.; THOMASON, J.M. et al. The effect of cyclosporin on cell division and apoptosis in human oral keratinocytes. **J Periodont Res** 41: 297-302, 2006.

BÖKENKAMP, A.; BOHNHORST, B.; BEIER, C. et al. Nifedipine aggravates cyclosporine-A induced gingival hyperplasia. **Pediatr Nephrol** 8: 181-185, 1994.

BOLTCHI, F.E.; REES, T.D.; IACOPINO, A.M. Cyclosporine A induced gingival overgrowth: a comprehensive review. **Quintessence Int** 30: 775-783, 1999.

BORDER, W.A.; NOBLE A.; RUOSLAHTI, E. et al. Transforming growth factor- β : The dark side of tissue repair. **J Clin Invest** 90: 1-7, 1992.

BORATYNSKA, M.; RADWAN-OCZKO, M.; FALKIEWICZ, K. et al. Gingival overgrowth in kidney transplant recipients treated with cyclosporine and its relationship with chronic graft nephropathy. **Transplant Proc** 35 (6): 2238-2240, 2004.

BRAHMATEWARI, J.; SERAFINI, A.; SERRALTA, V. et al. The effects of topical transforming growth factor-beta2 and anti-transforming growth factor-beta2,3 on scarring in pigs. **J Cutan Med Surg** 4(3): 126-131, 2000.

BRONSON, R.E.; TREAT, J.A.; BERTOLAMI, C.N. Fibroblastic subpopulations in uninjured and wounded rabbit oral mucosa. **J Dent Res** 68(1):51-8, 1989.

CEBECI, I.; KANTARCI, A.; FIRATLI, E. et al. Evaluation of the frequency of HLA determinants in patients with gingival overgrowth induced by cyclosporine-A. **J Clin Periodontol**. 23: 737-742, 1996.

CHAND, D.H.; QUATTROCCHI, J.; POE, S.A. et al. Trial of metronidazole vs. azithromycin for treatment of cyclosporine-induced gingival overgrowth. **Pediatr Transplant** 8: 60-64, 2004.

CHEN, Y-T.; TU, H-P.; CHIN, Y-T. et al. Upregulation of Transforming Growth Factor- β 1 and Vascular Endothelial Growth Factor gene and protein expression in Cyclosporin-induced overgrowth edentulous gingival in rats. **J Periodontol** 76: 2267-2275, 2005.

CITTERIO, F.; DI PINTO, M.T.; BORZI, M.C. et al. Azithromycin treatment of gingival hyperplasia in kidney transplant recipients is effective and safe. **Transplant Proc** 33: 2134-2135, 2001.

COTRIM, P.; MARTELLI-JUNIOR, H.; GRANER, E. et al. Cyclosporin A induces proliferation in human gingival fibroblasts via induction of Transforming Growth Factor- β 1. **J Periodontol** 74: 1625-1633, 2003.

DALEY, T.D.; WYSOCKI, G.P. Cyclosporin therapy. **J Periodontol** 55: 708-712, 1984.

DALEY, T.D.; WYSOCKI, G.P.; DAY, C. Clinical and pharmacologic correlations in cyclosporine-induced gingival hyperplasia. **Oral Surg Oral Med Oral Path** 62: 417-421, 1986.

DE MATTOS, A.M.; OLYAEI, A.J.; BENNETT, W. M. Pharmacology of immunosuppressive medications used in renal diseases and transplantation. **Am J Kidney Dis** 28: 631-667, 1996.

ELLIS, J. S.; SEYMOUR, R.A.; STEELE, J.G. et al. Prevalence of gingival overgrowth induced by calcium channel blockers: A community-based study. **J Periodontol** 70: 63-67, 1999.

FISHER, R.G.; EDWARDSSON, S.; KLINGE, B. et al. The effect of cyclosporin-A on the oral microflora at gingival sulcus of the ferret. **J Clin Periodontol**. 23: 853-860, 1996.

FU, E.; NIEH, S.; CHANG, H-L. et al. Dose-dependent gingival overgrowth induced by cyclosporin in rats. **J Periodontol**. 66: 594-598, 1995.

FU, E.; NIEH, S.; CHANG, H-L. et al. Cyclosporin A-induced gingival overgrowth in rats: macroscopic and microscopic observations. **Int J Periodont Rest Dent** 16: 279-291, 1996.

FU, E.; NIEH, S.; WIKESJÖ, U. The effect of plaque retention on cyclosporin-induced gingival overgrowth in rats. **J Periodontol** 68: 92-98, 1997.

GÓMEZ, E.; SÁNCHEZ-NUÑES, M.; SÁNCHEZ, J.E. et al. Treatment of cyclosporin-induced gingival hyperplasia with azithromycin. **Nephrol Dial Transplant** 12: 2694-2697, 1997.

HASSELL, T.M. & STANEK, E.J. Evidence that healthy human gingival contains functionally heterogeneous fibroblast subpopulations. **Arch Oral Biol** 28: 617-625, 1983.

HOLT, S., BRAMANTI, T. E. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. **Critical Rev Oral Biol Med** 2: 177-281, 1991.

IACOPINO, A.M.; DOXEY, D.; CUTLER, C.W. et al. 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** 68: 73-83, 1997.

IANARO, A.; IALENTI, A; MAFFIA, P. et al. Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics. **Pharmacol Exper Therap** 292(1): 156-163, 2000.

IHN H. Pathogenesis of fibrosis: Role of TGF- β and CTGF. **Curr Opin Rheumatol** 14: 681-685, 2002.

IRWIN, C.R.; PICARDO, M.; ELLIS, I. et al. Inter- and intra-site heterogeneity in the expression of fetal-like phenotypic characteristics by gingival fibroblasts: Potential significance for wound healing. **J Cell Science** 107: 1333-1346, 1994.

ISLAM, M.; BURKE, J.F.; MCGOWAN, T. A et al, Effect of anti-transforming growth factor-beta antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction. **Kidney Int** 59: 498-506, 2001.

JACOBS, D.; BUCHANAN, J.; CUCHENS, M. et al. The effect of cyclosporin metabolite OL-17 on gingival fibroblast sub-populations. **J Dent Res** 69: 221, 1990.

JAMES, J.A; IRWIN, C.R.; LINDEN, G.J. The effects of culture environment on the response of human gingival fibroblast to cyclosporin. **J Periodontol** 66: 339-344, 1995.

JAMES, J.A.; IRWIN, C.R.; LINDEN, G.J. TGF- β 1 alters the production of collagen types I and III by human gingival fibroblasts. **Biochem Soc Trans** 24(1): 142, 1996.

JAMES, J.A.; IRWIN, C.R.; LINDEN, G.J. Gingival fibroblast response to cyclosporin A and transforming growth factor beta 1. **J Periodontol Res** 33: 40-48, 1998.

JAMES, J.A.; JAMAL, S.; HULL, P.S. Tacrolimus is not association with gingival overgrowth in renal transplant patients. **J Clin Periodontol** 28: 848-852, 2001.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. O Trato Digestivo In: JUNQUEIRA, L.C.U. **Histologia Básica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 540p.

KAHAN, B.D. Cyclosporine. **N Engl J Med** 321: 1725-1738, 1989.

KJELDSEN, M.; HOLMSTRUP, P.; BENDTZEN, K. Marginal periodontitis and cytokines: a review of the literature. **J Periodont** 64: 1013-1022, 1993.

KOHNLE, M.; LUTKES, P.; ZIMMERMANN, U. et al. Conversion from cyclosporine to tacrolimus in renal transplant recipients with gum hyperplasia. **Transplant Proc** 31: 44S-45S, 1999.

KWUN, W.H.; SUH, B.Y.; KWUN, K.B. Effect of azithromycin in the treatment of cyclosporine-induced gingival hyperplasia in renal transplant recipients. **Transplant Proc** 35(1): 311-312, 2003.

LINDHE, J.; KARRING, T. Anatomia do Periodonto In: LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 1048p.

MARGIOTTA, V.; PIZZO, I.; PIZZO, G. et al. Cyclosporin-and nifedipine-induced gingival overgrowth in renal transplant patients: correlations with periodontal and pharmacological parameters, and HLA- antigens. **J Oral Pathol Med** 25: 128-134, 1996.

MASSGUE, J. The transforming growth factor- β family. **Ann Rev Cell Biol** 6: 597-641, 1990.

Mc GAW, W. T.; LAM, S.; COATES, J. Cyclosporine-induced gingival overgrowth: correlation with dental plaque scores, gingivitis scores and cyclosporine levels in serum and saliva. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 64: 293-297, 1987.

Mc KEVITT, K.T.; 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** 24: 66-71, 1995.

MORISAKI, I.; KATO, K.; LOYOLA-RODRIGUEZ, J. P. et al. Nifedipine-induced gingival overgrowth in the presence of gingival inflammation in rats. **J Periodont Res** 28: 396-403, 1993.

MORISAKI, I.; AKIYAMA, Y. M.; MIYAWAKY, Y.N. et al. Positive correlation between blood cyclosporin A level and severity of gingival overgrowth in rats. **J Periodontol** 68: 7-11, 1997.

NASH, M.M.; ZALTZMAN, J.S. Efficacy of azithromycin in the treatment of cyclosporin-induced gingival hyperplasia among renal transplant recipients. **Transplant Proc** 30: 2117-2119, 1998.

- NEWELL, J.; IRWIN, C.R. Comparative effects of cyclosporin on glycosaminoglycan synthesis by gingival fibroblasts. **J Periodontol** 68: 443-447, 1997.
- NIEH, S.; FU, E.; CHANG, H-L. et al. Histopathologic alterations of periodontium in cyclosporin-treated rats. **J Clin Periodontol** 23: 730-736, 1996.
- NISHIKAWA, S.; NAGATA, T.; MORISAKI, I. et al. Pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. **J Periodontol** 67: 463-471, 1996.
- O'VALLE, F.; MESA, F.; ANEIROS, J. et al. Gingival overgrowth induced by nifedipine and cyclosporin A. **J Clin Periodontol** 22: 591-597, 1995.
- PAGLIARINI, A.; STABELLINI, G.; CARINCI, F. et al. Heterogeneity of fibroblasts derived from human free and attached gingiva. Glycosaminoglycan synthesis and effects of phenytoin (PHT) treatment. **J Oral Pathol Med** 24: 72-77, 1995.
- PAIK, J-W.; KIM C-S.; CHO K-S. et al. Inhibition of cyclosporin A-induced gingival overgrowth by azithromycin through phagocytosis: an in vivo and in vitro study. **J Periodontol** 75: 380-387, 2004.
- PERNU, H.E.; PERNU, L.M.H.; HUTTUNEN, K.R.H. et al. Gingival overgrowth among renal transplant recipients related to immunosuppressive medication and possible local background factors. **J Periodontol** 63: 548-553, 1992.
- PERNU, H.E.; KNUUTTILA, M.L.E.; HUTTUNEN, K.R.S. et al. Drug-induced gingival overgrowth and class II major histocompatibility antigens. **Transplant** 57: 1811-1813, 1994.
- PRASHAR, Y; KHANNA, A; SEHAJPAL, P. et al. Simulation of transforming growth factor-beta-1 transcription by cyclosporine. **Febs Lett** 358: 109-112, 1995.
- RAMALHO, V.L.C.; RAMALHO, H.J.; CIPULLO, J.P. et al. Hiperplasia gingival induzida por ciclosporina A. *Rer Assoc Med Brás* 49(2): 1-9, 2003.
- RATEITSCHAK-PLUSS, E.M.; HEFTI, A.; LOERTSCHER, R. et al. Initial observation that cyclosporine-A induces gingival enlargement in man. **J Clin Periodontol** 10: 237-246, 1983.
- REDLICH, H.; GREENFELD, Z.; COOPERMAN, H et al. Lack of influence of cyclosporin A on levels of gingival procollagen types I and III mRNAs in rats of different ages. **Arch Oral Biol** 42: 277-282, 1997.
- RITZERFELD, W. Efficacy of bacampicillin and ampicillin in experimental pyelonephritis in the rat. **Infection** 7(5): S443-445, 1979.
- ROBERTS, A.B.; ANZANO, M.A.; MEYERS, C.A. et al. Purification and properties of a type β transforming growth factor from bovine kidney. **Biochemistry** 22: 5692-5698, 1983.

- ROSTOCK, M.H.; FRY, H.R.; TURNER, J.E. Severe gingival overgrowth associated with cyclosporine therapy. **J Periodontol** 57: 294-299, 1986.
- RUHL, S.; HAMBERGER, S.; BETZ, R. et al. Salivary proteins and cytokines in drug-induced gingival overgrowth. **J Dent Res** 83(4): 322-326, 2004.
- SAITO, K.; MORI, S.; IWAKURA, M. et al. Immunohistochemical localization of transforming growth factor b, basic fibroblast growth factor and heparan sulphate glycosaminoglycan in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. **J Periodont Res** 31: 545-555, 1996.
- SAITO, K.; MORI, S.; IWAKURA, M. et al. Immunohistochemical study on the pathogenesis of drug-induced gingival hyperplasia. **Internat Congress Ser** 1284: 85-86, 2005.
- SCHINCAGLIA, G.P.; FORNITI, F.; CAVALLINI, R. et al. Cyclosporin-A increases type I procollagen production and mRNA level in human gingival fibroblasts in vitro. **J Oral Pathol Med** 21: 181-185, 1992.
- SEIBEL, W. YAHIA, N. A.; Mc CLEARY, L. B. et al. Cyclosporine-induced gingival overgrowth in beagle dogs. **J Oral Pathol Med** 18: 24-245, 1989.
- SERPERO, L.; PETECCHIA, L.; SABATINI, F. et al. The effect of transforming growth factor (TGF- β_1 and TGF- β_2) on nasal polyp fibroblast activities involved upper airway remodeling: Modulation by fluticasone propionate. **Immunol Lett** 105: 61-67, 2006.
- SEYMOUR, R.A.; SMITH, D. G.; TURNBULL, D. N. The effects of phenytoin and sodium valproate on the periodontal health of adult epileptic patients. **J Clin Periodontol** 12: 413-419, 1985.
- SEYMOUR, R.A.; SMITH, D.G.; ROGERS, S.R. The comparative effect of azathioprine and cyclosporin on some gingival health parameters of renal transplant patients. **J Clin Periodontol** 14: 610-613, 1987.
- SEYMOUR, R.A.; SMITH, D.G. The effect of plaque control program on the incidence and severity of cyclosporine-induced gingival changes. **J Clin Periodontol** 18: 107-110, 1991.
- SEYMOUR, R.A.; JACOBS, D.J. Cyclosporin and the gingival tissues. **J Clin Periodontol** 19: 1-11, 1992.
- SEYMOUR, R.A.; THOMASON, J.M.; ELLIS, J.S. The pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. **J Clin Periodontol** 23: 165-175, 1996.
- SHAH, M.; FOREMAN, D. M.; FERGUSON, M.W.J. Neutralisation of TGF- β_1 and TGF- β_2 or exogenous addition of TGF- β_3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. **J Cell Sci** 108: 985-1002, 1995.

SHIHAB, F. S.; ANDOH, T.F.; TANNER, A.M. et al. Role of transforming growth factor-beta1 in experimental chronic cyclosporine nephropathy. **Kidney Int** 49: 1141-1151, 1996.

SLAVIN, J.; TAYLOR, J. Cyclosporin, nifedipine, and gingival hyperplasia. **Lancet** 2:739, 1987.

SMITH, P.D.; POLO, M.; SOLER, P.M. et al. Efficacy of growth factors in the accelerated closure of interstices in explanted meshed human skin grafts. **J Burn Care Rehabil** 21: 5-9, 2000.

SOMACARRERA, M.L.; HERNÁNDEZ, G.; ACERO, J. et al. Factors related to the incidence and severity of cyclosporine-induced gingival overgrowth in transplant patients. **J Periodontol** 65: 671-675, 1994.

SOORIYAMOORTHY, M.; GOWER, D.B.; ELEY, B.M. Androgen metabolism in gingival hyperplasia induced by nifedipine and cyclosporine. **J Periodontol Res** 25: 25-30, 1990.

SPOLIDORIO, L.C.; SPOLIDORIO, D.M.P.; BENATTI, C. et al. Combined effects of cyclosporin and nifedipine on gingival overgrowth in rats is not age dependent. **J Periodontol Res** 38: 375-379, 2003.

SPOLIDORIO, L.C.; SPOLIDORIO, D.M.P.; HOLZHAUSEN, M. et al. Effects of long-term cyclosporin therapy on gingival of rats – analysis by stereological and biochemical estimation. **Braz Oral Res** 19(2): 112-118, 2005a.

SPOLIDORIO, L.C.; HOLZHAUSEN, M.; SPOLIDORIO, D.M.P. et al. Cyclosporin but not tacrolimus significantly increases salivary cytokine contents in rats. **J Periodontol** 76: 1520-1525, 2005b.

SPOLIDORIO, L.C.; SPOLIDORIO, D.M.P.; MASSUCATO, E.M.S. et al. Oral health in renal transplant recipients administered cyclosporin A or tacrolimus. **Oral Diseases** 12: 309-314, 2006.

SPRATT, H.; BOOMER, S.; IRWIN, C.R. et al. Cyclosporine associated gingival overgrowth in renal transplant recipients. **Oral Diseases** 5: 27-31, 1999.

TAVASSOLI, S.; YAMALIK, N.; ÇAGLAYAN, F. et al. The clinical effects of nifedipine on periodontal status. **J Periodontol**. v.69. p.108-112, 1998.

TEN CATE, A. R.; MILLIS, C.; SOLOMON, G. The development of the periodontium. **Anat Rec**. v.170. p.365-388, 1971.

THOMAS, D.W.; NEWCOMBE, R. G.; OSBORNE, G.R. Risk factors in the development of cyclosporine-induced gingival overgrowth. **Transplant** 69(4): 522-526, 2000.

THOMASON, J.M.; SEYMOUR, R.A.; RICE, N. Prevalence and severity of cyclosporine and nifedipine.-induced gingival overgrowth. **J Clin Periodontol** 20: 37-40, 1993.

THOMASON, J.M.; SEYMOUR, R.A.; ELLIS, J.S. et al. Determinants of gingival overgrowth severity in organ transplant patients. An examination of the role of HLA phenotype. **J Clin Periodontol** 23: 628-634, 1996.

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** 25: 554-560, 1998.

THORP, M.; DeMATTOS, A.; BENNETT, W. et al. The effect of conversion from cyclosporine to tacrolimus on gingival hyperplasia, hirsutism and cholesterol. **Transplant** 69: 1218-1220, 2000.

TIPTON, D.A.; DABBOUS, M. K. Autocrine transforming growth factor- β stimulation of extracellular matrix production by fibroblasts from fibrotic human gingival. **J Periodontol** 69: 609-619, 1998.

TOKGOZ, B.; SARI, H.I.; YILDIZ, O. et al. Effects of azithromycin on cyclosporine-induced gingival hyperplasia in renal transplant patients. **Transplant Proc** 36(9): 2699-2702, 2004.

TONE, A.; SHIKATA, K.; SASAKI, M. et al. Erythromycin ameliorates renal injury via anti-inflammatory effects in experimental diabetic rats. **Diabetologia** 48: 2402-2411, 2005.

TORREZAN, P.R.; SOBRINHO, J.A.; DENARDIN, O.V.P. et al. Hipertrofia gingival em transplantados renais. **Rev Assoc Med Bras** 51(4): 200-205, 2005.

TRACKMAN, P.C.; KANTARCI, A. Connective tissue metabolism and gingival overgrowth. **Crit Rev Oral Biol Med** 15(3): 165-175, 2004.

TYLDESLEY, W.R.; ROTTER, E. Gingival hyperplasia induced by cyclosporin-A. **Br Dent J** 157: 305-309, 1984.

UENO, S.; AOKI, D.; KUBO, F. et al. Roxithromycin Inhibits Constitutive Activation of Nuclear Factor κ -B by Diminishing Oxidative Stress in a Rat Model of Hepatocellular Carcinoma. **Clin Cancer Res** 11: 5645-5650, 2005.

WAHLSTROM, E.; ZAMORA, J. V.; TEICHMAN, S. Improvement in cyclosporine associated gingival hiperplasia with azithromycin therapy. **N Engl J Med** 332-353, 1995.

WILSON, R.F.; MOREL, A.; SMITH, D. et al. Contribution of individual drugs to gingival overgrowth in adult and juvenile renal transplant patients treated with multiple therapy. **J Clin Periodontol** 25: 457-464, 1998.

WIRNSBERGER, G.H.; PFRAGNER, R.; MAURIC, A. et al. Effect of antibiotic treatment azithromycin on cyclosporine A-induced gingival hyperplasia among renal transplant recipients. **Transplant Proc** 30: 2117-2119, 1998.

WISOCKI, G.P.; GRETZINGER, H.A.; LAUPACIS, A. et al. Fibrous hyperplasia of gingival: a side effect of cyclosporin-A therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 55: 274-278, 1983.

WONDIMU, B.; DAHLLOF, G.; BERG, U. et al. Cyclosporine-A induced gingival overgrowth in renal transplant children. **Scand J Dent Res** 101: 282-286, 1993.

WONDIMU, B.; NEMETH, A; MODEER, T. Oral health in liver transplant children administered cyclosporin A or tacrolimus. **Int J Paediatr Dent** 11(6): 424-9, 2001.

WONG, W.; HODGE, M.G.; LEWIS, A. et al. Resolution of cyclosporin-induced gingival hypertrophy with metronidazole. **Lancet** .343-386, 1994.

WRIGHT, H. J.; CHAPPLE, I. L. C.; MATTHEWS, J.B. TGF- β isoforms and TGF- β receptors in drug-induced gingival and hereditary gingival overgrowth. **J Oral Pathol** 30: 281-289, 2001.

WRIGHT, H.J.; CHAPPLE, I.L.C.; BLAIR, F. et al. Crevicular fluid levels of TGF- β 1 in drug-induced gingival overgrowth. **Oral Biol** 49: 421-425, 2004.

YAGIELA, J.A.; NEIDLE, E.A.; DOWD, F.J. Antibióticos antibacterianos. In: YAGIELA, J.A. **Farmacologia e Terapéutica para Dentistas**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 717p.

YAMABE, H.; SHIMADA, M.; KAIZUKA, M. et al. Roxithromycin inhibits transforming growth factor- β production by cultured human mesangial cells. **Nephrology** 11: 524-530, 2006.

YOSHIDA, T.; NAGATA, J.; YAMANE, A. Growth factors and proliferation of cultured rat gingival cells in response to cyclosporin A. **J Periodont Res** 40: 11-19, 2005.

ZEBROWSKI, E. J.; SINGER, D.L.; BRUNKA, J.R. Cyclosporin-A nifedipine and phenytoin: comparative effects on gingival fibroblast metabolism. **J Dent Res** 65: 331, 1986.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)