

Introdução e Metodologia

Miofibroblastos, as principais células envolvidas em doenças fibróticas como a fibromatose gengival hereditária (FGH), são caracterizados pela grande expressão da isoforma α da actina de musculatura lisa (α -SMA). Em estudos prévios, nós demonstramos que o tratamento de fibroblastos de gengiva normal (GN) com TGF- β 1 induz a transdiferenciação em miofibroblastos. Por outro lado, o tratamento com IFN γ bloqueou a expressão de α -SMA de uma maneira dose e tempo dependente sugerindo que este previne a transdiferenciação induzida pelo TGF- β 1. Concomitante com a inibição da transdiferenciação ocorreu um aumento na expressão de Smad 7, um inibidor da cascata de sinalização de TGF- β 1. O objetivo deste projeto foi determinar os efeitos da super-expressão de Smad 7 na prevenção da transdiferenciação de fibroblastos de GN em miofibroblastos induzida por TGF- β 1. Para determinar os efeitos da super-expressão de Smad 7, clones celulares específicos de GN foram transfectados com plasmídeos contendo a sequência completa do cDNA humano de Smad 7 ou plasmídeos expressando o gene bacteriano CAT. Após caracterização, os clones foram tratados com TGF- β 1 em uma concentração de 10 ng/ml. O efeito na transdiferenciação celular foi determinado pela detecção do marcador específico de miofibroblastos α -SMA por ensaios semi-quantitativos da transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e western blot.

Resultados e Discussão

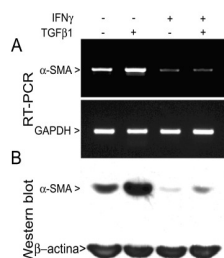


Figura 1. IFN γ inibe a transdiferenciação dos miofibroblastos induzida por TGF- β 1. Fibroblastos de GN foram incubados com 10 ng/ml de TGF- β 1, 10⁶ U/ml IFN γ ou concomitantemente com TGF- β 1 e IFN γ por 3 dias. Seguindo o tratamento, células foram analisadas por RT-PCR (A) ou western blot (B). IFN γ inibiu a transdiferenciação dos fibroblastos gengivais em miofibroblastos induzida por TGF- β 1.

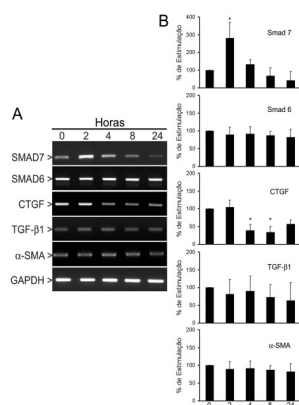


Figura 2. IFN γ significativamente estimula a expressão de Smad 7 e inibe a expressão de CTGF. Fibroblastos de GN submetidos ao tratamento com IFN γ foram coletados em vários períodos de tempo e analisados por RT-PCR. IFN γ estimulou significativamente a expressão de Smad 7, o que precedeu a inibição de CTGF. O tratamento com IFN γ não alterou significativamente a expressão de Smad 6, TGF- β 1 e α -SMA. *p<0,05

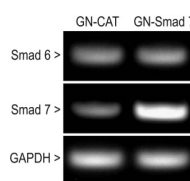


Figura 4. Caracterização dos clones específicos. Análise por RT-PCR dos níveis de Smad 6 e Smad 7 nos clones celulares transfectados com o plasmídeo contendo o gene controle CAT e o gene Smad7. Este resultado demonstra que as células transfectadas com o plasmídeo contendo o gene Smad 7 apresentam uma expressão marcadamente maior de Smad 7 comparado com as células controle. A expressão de Smad 6 não foi modulada.

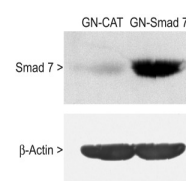


Figura 5. Análise por western blot dos clones específicos transfectados com o gene controle CAT e com o gene Smad 7. A reação de b-actina foi utilizada como controle. Este ensaio demonstrou que existe uma diferença marcante dos níveis de produção de Smad 7 das células transfectadas com o plasmídeo Smad 7 em comparação com plasmídeo controle.

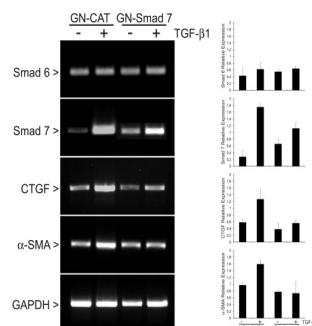


Figura 6. Super-expressão de Smad 7 inibe a transdiferenciação em miofibroblastos induzida por TGF- β 1. Clones tratados com TGF- β 1 por 3 dias foram coletados e submetidos a ensaios de RT-PCR com primers específico para Smad 6, Smad 7, CTGF, α -SMA e GAPDH, este último como controle da reação. Como antecipado, super-expressão de Smad 7 preveniu a transdiferenciação em miofibroblastos induzida por TGF- β 1. Simultaneamente, a super-expressão de Smad 7 bloqueou a ativação de CTGF associada com a cascata de sinalização de TGF- β 1.

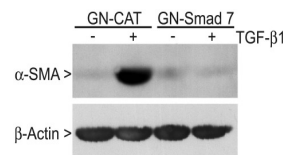


Figura 8. Análise por western blot demonstrando que a super-expressão de Smad 7 bloqueia a indução da transdiferenciação de fibroblastos gengivais em miofibroblastos induzida por TGF- β 1. Clones foram tratados com 10 ng/ml de TGF- β 1 e submetidos a análise de western blot com anticorpos específicos contra α -SMA e β -actina.

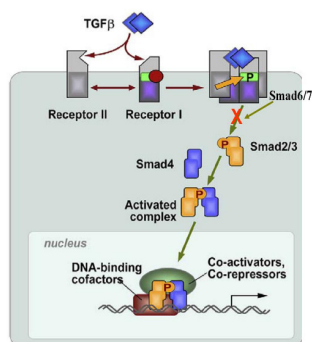


Figura 3. Cascata de sinalização de TGF- β 1. Após ligação de TGF- β 1 aos seus receptores transmembrânicos (TGFR I e TGFR II), Smad 2 e/ou Smad 3 são fosforilados e se ligam ao co-fator Smad 4. Este complexo é translocado ao núcleo onde pode funcionar diretamente como fator de transcrição. Como inibidores desta cascata, existem Smad 6 e Smad 7, que competem com Smad 2 e Smad 3 pelo sítio de ligação com o complexo ligante-receptor. Então, em condições fisiológicas ou condições induzidas, a super-expressão de Smad 7 pode bloquear a cascata de ativação de TGF- β 1.

Conclusões

A super-expressão de Smad 7 é efetiva no bloqueio parcial da transdiferenciação de fibroblastos gengivais em miofibroblastos promovida pelo tratamento com TGF- β 1, sugerindo que a inibição da cascata de ativação de TGF- β 1 via super-expressão de Smad 7 pode ser clinicamente efetivo no tratamento de aumentos gengivais de origem fibrótica.