

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**HERCÍLIO MARTELLI JÚNIOR
CIRURGIÃO DENTISTA**

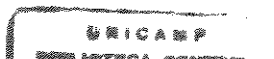
**ESTUDO DA SÍNTESE PROTÉICA DE Hsp47 e Sec61 α
DURANTE A TRANSLAÇÃO/TRANSLOCAÇÃO DE MOLÉCULAS
DE COLÁGENO TIPO I EM FIBROBLASTOS DE FIBROMATOSE
GENGIVAL HEREDITÁRIA.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do Título de Mestre em Biologia e
Patologia Buco-Dental.

PIRACICABA

2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

HERCÍLIO MARTELLI JÚNIOR
CIRURGIÃO DENTISTA

ESTUDO DA SÍNTESE PROTÉICA DE Hsp47 e Sec61 α
DURANTE A TRANSLAÇÃO/TRANSLOCAÇÃO DE MOLÉCULAS
DE COLÁGENO TIPO I EM FIBROBLASTOS DE FIBROMATOSE
GENGIVAL HEREDITÁRIA.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Resende Ferreira

Banca Examinadora: Prof. Dr. Luciano Resende Ferreira (Presidente)

Prof. Dr. Heitor Panzeri

Prof. Dr. Ricardo Dela Colleta

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do Título de Mestre em Biologia e
Patologia Buco-Dental.

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 15/06/2000


Assinatura do Orientador

PIRACICABA

2000

086507002

Ficha Catalográfica

M361e Martelli Júnior, Hercílio.
Estudo da síntese protéica de Hsp47 e Sec61 α durante a translação/translocação de moléculas de colágeno tipo I em fibroblastos de fibromatose gengival hereditária. / Hercílio Martelli Júnior. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2000.
105p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Luciano Resende Ferreira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Fibroblastos. 2. Colágeno. 3. Gengivas – Doenças. I. Ferreira, Luciano Resende. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB / 8 – 6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 29 de Fevereiro de 2000, considerou o candidato HERCÍLIO MARTELLI JÚNIOR aprovado.

1. Prof. Dr. LUCIANO RESENDE FERREIRA Luciano Resende Ferreira

2. Prof. Dr. HEITOR PANZERI

Heitor Panzeri

3. Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

Ricardo Della Coletta

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

"Existe um mundo que acontece pelo desenrolar lógico da história, em toda sua crueza e insensibilidade. Mas há um mundo igualmente concreto que nasce dos sonhos: a Pietá, de Michelangelo, o Beijo de Rodin, as telas de Van Gogh e Monet, as músicas de Tom Jobim, os livros de Guimarães Rosa e Saramago: eles existiram primeiro como sonhos, antes de existirem como fatos. Quando os sonhos assumem forma concreta, surge a beleza que leva ao Criador DEUS".

Aos meus pais, pela paz e afeto transmitidos à minha formação e meus irmãos.

À Daniella Reis Barbosa,
pelo amor, carinho e participação
em minha vida e sua família.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao Reitor da Universidade de Alfenas - Professor Édson Antonio Velano.

Ao Professor Doutor Antônio Fernando Martorelli de Lima, Livre-Docente da Área de Periodontia da Universidade Estadual de Campinas, pela confiança e amizade sempre presentes.

À Gláucia Bolzani pelos ensinamentos e paciência nos "primeiros passos" dos experimentos.

À Professora Helena Engel, da Área de Endodontia da Universidade de Alfenas, pela presença, ternura e apoio constante em minhas atividades.

Aos Professores Doutores Márcio Ajudarte Lopes, Jacks Jorge Júnior Pablo Augustin Vargas e Lourenço Bozzo do Departamento de Diagnóstico Oral da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Professor Doutor Luciano Resende Ferreira pela amizade,
confiança e liberdade presentes neste estudo e nas demais atividades.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

Aos Professores Doutores Edgard Graner e Ricardo Della Coletta da Área de Patologia e Genética da Universidade Estadual de Campinas, pela presença, perseverança e humildade com que têm conduzido suas muitas atividades e efetiva participação no meu dia a dia e minha formação.

"O que é que se encontra no início? O jardim ou jardineiro? É o jardineiro. Havendo um jardineiro, mais cedo ou mais tarde um jardim aparecerá. O que é um jardineiro? Uma pessoa cujo pensamento está cheio de jardins. O que faz um jardim são os pensamentos do jardineiro. O que faz uma equipe são os pensamentos daquele que a dirige e seus exemplos".

Professor Doutor Oslei Paes de Almeida
Muito Obrigado pelo exemplo e compreensão.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FAPESP

Pelo suporte financeiro na forma de Bolsa de Mestrado

Processo - 98/02243-6

Ao Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum, Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas.

À Prof^a. Dr^a. Altair Antoninha Del Bel Cury, Coordenadora de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas.

À Prof^a. Dr^a. Darcy de Oliveira Tosello, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas.

À todos os professores e alunos do Curso de Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas.

Aos colegas da Patologia, Semiologia e Periodontia (Daniela Bazan Palioto e Julio Cesar Joly) pela amizade e apoio durante o Mestrado.

Aos funcionários amigos da Patologia - Adriano, Ana Cristina, Maria Helena e Rosa Maria pela presença e ajuda constante nesta jornada.

E a todos àqueles que de forma direta ou indireta fizeram com que o curso fosse agradável e prazeroso em todos os momentos.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Capítulos	p
1-Lista de Abreviaturas	15
2-Resumo	17
3-Abstract	19
4-Introdução	21
5-Revisão da Literatura	24
5.1-Fibromatose Gengival Hereditária	24
5.2- <i>Chaperones</i> Moleculares e Proteínas de Choque Térmico	30
5.2.1-Hsp47	37
5.3-Colágeno	44
5.4-Translocação de Proteínas Através do Retículo Endoplasmático	46
5.4.1-Síntese Protéica	46
5.4.2-Canais Condutores de Proteínas e Sec61 α	48
6-Proposição	52
7-Materiais e Métodos	54
7.1-Pacientes	54
7.2-Cultura de células	55
7.3-Anticorpos contra Hsp47 e Sec61 α	57
7.4-Preparação de Extratos Lisados de Fibroblastos	58
7.5-Eletroforese e Western Blot	58
7.6-Efeito do Tratamento com Calor	59
7.7-Análise Estatística	59
8-Resultados	61
8.1-Aspectos Clínicos e Histopatológicos	61
8.2-Aspectos Morfológicos das Células em Cultura	62
8.3-Análise da Síntese Protéica de Hsp47	63
8.4-Análise da Síntese Protéica de Sec61 α	64
9-Discussão	75
10-Conclusões	81
11-Referências Bibliográficas	83

LISTA DE ABREVIATURAS

1 - LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Siglas</i>	<i>Significado</i>
AgNOR	Região Organizadora Nucleolar Arginofílica
ATP	Adenosina Trifosfato
BrdU	Bromodeoxiuridina
C-terminal	Porção Carboxi-Terminal
DMEM	Meio de Cultura de Eagle Modificado por Dulbecco's
DMSO	Di-Metil Sulfóxido
FGH	Fibromatose Gengival Hereditária
GN	Gengiva Normal
Grp75	Proteína Regulada por Glicose de 75 kDa
Grp78	Proteína Regulada por Glicose de 78 kDa
Grp94	Proteína Regulada por Glicose de 94 kDa
HBSS	Solução Salina Balanceada de Hank's
Hsp73	Proteína de Choque Térmico Cognata de 73
Hsps	Proteínas de Choque Térmico
Hsp47	Proteína de Choque Térmico de 47 kDa
Hsp70	Proteína de Choque Térmico de 70 kDa
Hsp90	Proteína de Choque Térmico de 90 kDa
Il-4	Interleucina-4
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
MMP	Metaloproteinase de Matriz
MTT	3,4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
N-terminal	Porção Amino-Terminal
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PRS	Partícula Reconhedora de Sinal
RE	Retículo Endoplasmático
RT-PCR	Transcriptase Reversa-Reação de Cadeia de Polimerase
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Sv40	Vírus Simian 40
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante β
TIMP	Inibidor Tecidual de Metaloproteinase de Matriz

RESUMO

2 - RESUMO

Fibromatose Gengival Hereditária (FGH) representa uma condição oral incomum (1:750.000), caracterizada por um aumento gengival fibrótico generalizado. Manifesta-se como entidade clínica isolada ou como parte de síndromes, produzindo excessiva quantidade de colágeno e outras moléculas da matriz extra-celular. Hsp47 é uma *chaperone* residente no retículo endoplasmático (RE) que liga especificamente a moléculas de colágeno, enquanto Sec61 α representa uma proteína transmembrânica com ativa participação na condução de cadeias polipeptídicas nascentes para o lúmen do RE. Este trabalho descreve a participação das proteínas Hsp47 e Sec61 α em culturas de fibroblastos provenientes de uma única família portadora de FGH e de pacientes com gengiva normal (GN) nos eventos de translação/translocação de colágeno tipo I. Ensaio de Western blot mostraram uma produção aumentada de Hsp47 em fibroblastos de FGH, comparado a fibroblastos de GN em condições de homeostasia e em situações de estresse térmico. Além disso, foi demonstrado produção de Sec61 α nas linhagens celulares, FGH e GN, porém sem diferenças nos padrões de produção. A maior produção de Hsp47 pode estar envolvida na proteção da degradação intra reticular de colágeno, podendo ser um dos fatores responsáveis pela fibrose característica desta doença. Embora os mecanismos biológicos responsáveis pela FGH sejam ainda desconhecidos, o conhecimento da participação destas proteínas na regulação da biosíntese de colágeno pode ser importante para o entendimento de condições genéticas, como a FGH.

Palavras Chaves: Fibromatose Gengival Hereditária; Colágeno; Hsp47; Sec61 α .

ABSTRACT

3 - ABSTRACT

Study of the synthesis of Hsp47 and Sec61 α during the events of translations/translocations of collagen type I in fibroblasts from hereditary gingival fibromatosis

Hereditary Gingival Fibromatosis (HGF) represents an uncommon oral condition (1:750,000) characterized fibrous gingival enlargement. HGF can manifest as an isolated clinical entity or as part of a syndrome. The gingiva of patients with HGF produce excessive amount of collagen and other extracellular matrix. Hsp47 is an endoplasmic reticulum (ER) resident chaperone which binds specifically to collagen molecules, and Sec61 α represents a transmembranous protein with active role in conducting of nascent polypeptide chain into the ER. This study describes the role of Hsp47 and Sec61 α during the events of translation/translocation of collagen type I in fibroblasts from patients with HGF and patients presenting normal gingiva (NG). Western blot assays demonstrated an increased production of Hsp47 in fibroblasts HGF as compared to NG cells under stress and unstressed conditions. In addition, Sec61 α was evenly found in both cell types showing no marked variations in quantity in both stressed or unstressed situations. The more increased production of Hsp47 may related to a collagen degradation protective mechanism inside the ER. This can be one of the factors responsible for the fibrous features of HGF. Although the exact biological mechanisms involved in HGF are still unknown, the study of these ER proteins role in regulating collagen biosynthesis may be important for understanding hereditary conditions such as HGF.

Key Words: Hereditary Gingival Fibromatosis; Collagen; Hsp47; Sec61 α .

INTRODUÇÃO

4 - INTRODUÇÃO

Fibromatose Gengival Hereditária (FGH) é uma condição oral incomum, afetando 1:750.000 indivíduos (Singer et al. 1993), caracterizada por um aumento fibrótico generalizado do tecido gengival, com quantidade excessiva de colágeno e outras moléculas da matriz extra-celular (Tipton e Dabbous, 1998). A FGH é vista como um achado clínico isolado, ou mais raramente associado a outras alterações, tais como hipertricose, retardo mental, epilepsia, compondo variadas síndromes. Clinicamente, a gengiva apresenta-se fibrótica, não hemorrágica e com pontilhado superficial característico. Avaliação histopatológica revela um tecido epitelial hiperplásico e acantótico com longas e delgadas criptas epiteliais que se projetam em direção ao conjuntivo subjacente, o qual é denso e rico em fibras colágenas. Geralmente, a FGH apresenta um padrão de herança autossômica dominante, podendo, entretanto, encontrar formas autossômicas recessivas. É aceito que a FGH é uma alteração genética, mas o mecanismo pelo qual o aumento gengival ocorre, ainda é desconhecido, tendo sido já descrito alterações nas metaloproteinases de matriz (MMP-1 e MMP-2) em fibroblastos de FGH (Coletta, 2000a), e na participação de citocinas, como a TGF- β (Tipton e Dabbous, 1998). Devido a quantidade aumentada de colágeno encontrada na FGH, os fibroblatos parecem depender de mecanismos que garantam a produção de colágeno heterotrímeros, fornecendo um modelo para o estudo da interação do colágeno sintetizado por essas células com proteínas do RE.

Hsp47 é uma glicoproteína residente no RE e tem sido colocada na função principal de *chaperone*, garantindo assim a produção de colágeno tipo I (Ferreira et al., 1996). Moléculas com função de *chaperone* correspondem a

um grupo de proteínas implicadas no processo de aquisição de estrutura terciária, ligando-se a moléculas incompletamente estruturadas e a proteínas em processo de polimerização, permanecendo ligadas nesse estado até a proteína atingir a sua conformação final (Pelhan, 1989).

Previamente a associação com proteínas *chaperones*, as proteínas destinadas as alterações co e pós-traducionais são inseridas no lúmen do RE por meio de canais condutores de proteínas, tendo como principal componente a proteína Sec61 α . Esta representa uma proteína transmembrânica com ativa participação na condução de cadeias polipeptídicas nascentes para o interior do RE (Knight e High, 1998).

O objetivo deste estudo é verificar a síntese de duas proteínas, Hsp47 e Sec61 α , envolvidas nos eventos de translação/translocação de moléculas de colágeno tipo I em cultura de fibroblastos de pacientes de uma família portadora de FGH, comparado com fibroblastos de gengiva normal.

REVISÃO DA LITERATURA

5 - REVISÃO DA LITERATURA

5.1-Fibromatose Gengival Hereditária

Fibromatose Gengival é um termo genérico clinicamente utilizado para referir-se a um aumento de volume da gengiva, decorrente de um excessivo e abundante acúmulo de colágeno e proliferação fibroblástica difusa no tecido gengival (Page e Shroeder, 1982; Takagi et al., 1991). Várias classificações têm sido realizadas para as fibromatoses gengivais; podendo ser de natureza inflamatória, neoplásica, medicamentosa, hereditária, idiopática e iatrogênica. A fibromatose com padrão hereditário é denominada Fibromatose Gengival Hereditária (FGH), podendo ser ou não parte de síndromes.

A FGH foi inicialmente descrita por Gross em 1856 e o primeiro heredograma feito por Nasse em 1895. Posteriormente várias terminologias foram usadas, dentre elas: Hipertrofia das gengivas (Gross, 1856), Gengivoma (Ball, 1941), Gengivofibromatose Hereditária (Winstock, 1964) e Fibromatose Gengival Hereditária (Zackin e Weisberger, 1961). O termo FGH tem sido o mais comumente usado pelos autores e será adotado neste trabalho.

FGH é uma condição oral rara, 1:750.000 (Fletcher, 1966; Singer et al., 1993), sem predileção por sexo (Rushton, 1957), com crescimento lento e contínuo, não sendo relatado regressão espontânea. A gengiva apresenta-se firme, indolor, não hemorrágica, com coloração rosa e pontilhado superficial característico, afetando frequentemente a maxila e mandíbula, podendo resultar na cobertura das coroas dentais em variados graus (Sciubba e Niebloom, 1986; Bozzo et al., 1992; Bozzo et al., 1994). O aumento gengival pode ser parcial, sendo neste caso predominante na superfície palatina do túber da maxila.

Segundo Takagi et al. (1991), a FGH ocorre com mais frequência na segunda década de vida e parece estar mais fortemente associada com a erupção da dentição permanente (Emerson, 1965). A presença dos dentes parece ser necessária para a FGH ocorrer, porque a condição não é vista antes da erupção dental. Além disso, a FGH recidiva após procedimentos cirúrgicos periodontais e desaparece ou regride após extração dos mesmos (Alavandar, 1965 e Cuestas-Carneiro e Bornancini, 1988). Mcindoe e Smith (1958) sugeriram que não havia regressão da FGH durante a vida, sendo seu curso progressivo e acelerado pela erupção dos dentes permanentes. O grau de envolvimento gengival diminui com a idade e parece não estar relacionado com o nível de higiene oral (Fletcher, 1966). Porém, crescimento gengival tem sido observado durante a dentição decídua (Hine, 1952; Mcindoe e Smith, 1958), em desdentados totais (Rugles, 1925) e ao nascimento ou nos primeiros meses de vida (Kratz e Morin, 1987; Bozzo et al, 1994).

A FGH é comumente transmitida através de um gene autossômico dominante, de modo heterogêneo, embora padrões recessivos tenham sido descritos. Sua manifestação de forma isolada é mais comum do que quando participa de síndromes (Hartsfield et al., 1985; Gorlin et al., 1990; Hallet, 1995). O achado sindrômico mais comum relacionado a FGH é a hipertricose, a qual ocasionalmente associa-se a retardo mental e epilepsia. Estas manifestações e outras características raras estão descritas na tabela 1.

Bozzo et al. (1994), mostraram que a penetrância da FGH na mesma família deste estudo é completa, pois em nenhuma ocasião indivíduos não afetados, tiveram filhos afetados. Além disso, há evidências de expressão variável, sendo que irmãos de uma mesma família apresentavam graus variados de aumento gengival. É possível que a penetrância e expressão da

FGH possam variar entre diferentes famílias. Os relatos de fenótipos autossômicos recessivos, que são minoria em relação ao fenótipo dominante, segundo alguns autores provém de casamentos consanguíneos (Nevin, 1971). Porém, a consanguinidade não é a única e nem a explicação mais aceita. Descendentes de pessoas não aparentadas, cada qual portadora de um gene mutante, parece ser responsável pela maioria dos casos de doenças autossômicas recessivas, principalmente se o caráter recessivo apresentar alta frequência na população (Thompson e Thompson, 1993; Coletta, 1999). Embora fatores genéticos tenham uma efetiva participação na FGH, os mecanismos bioquímicos e os genes responsáveis por esta alteração permanecem desconhecidos (Shashi et al., 1999). Hart et al. (1998), estudando uma família de 32 pessoas, sendo 12 membros afetados para FGH, mostrou uma relação da FGH com o cromossomo 2p21, entre os locus D2S1788 e D2S441. A identificação das bases genéticas da FGH, proverão uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos e possibilitarão perspectivas para terapias mais eficientes nestes pacientes.

A FGH foi primeiramente descrita em microscopia óptica por Tomes em 1879. Esta condição é caracterizada histologicamente por um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, mostrando áreas de acantose (Johnson et al., 1986), e delgadas projeções epiteliais que se estendem em direção ao conjuntivo subjacente (Danesh-Meyer e Holborow, 1993; Singer et al., 1993). O tecido conjuntivo apresenta densos e espessos feixes de colágeno, entremeados por fibroblastos, com um discreto infiltrado inflamatório nas áreas perivasculares (Redman et al., 1985). Pequenos e múltiplos focos de calcificação distrófica, ilhas de metaplasia óssea, áreas de

ulceração e focos de células inflamatórias também foram descritos (Gunhan et al., 1995).

Barros (1991), concluiu através de estudos com microscopia eletrônica do tecido conjuntivo de pacientes portadores de FGH que as fibras colágenas exibiam um padrão de dissociação aumentado e variação de diâmetro. Esta autora observou, ainda, maior quantidade de fibras oxitalânicas e praticamente inexistência de fibras elásticas comparado a gengiva clinicamente normal.

Os mecanismos bioquímicos e moleculares que levam à formação excessiva de tecido gengival são desconhecidos e os estudos enfocando os principais eventos em cultura de células são controversos. Johnson et al. (1986), estudando fibroblastos gengivais em cultura, obtidos de uma criança de 13 anos de idade, portadora de aumento gengival acentuado, sem que qualquer outro membro da família apresentasse a anormalidade, demonstraram uma taxa de crescimento menor que as células obtidas de um adulto jovem normal e uma quantidade de colágeno menor que as células controle.

Shirasuna et al. (1989), estudando cultura de células de dois irmãos com fibromatose gengival, encontraram menores taxas de crescimento dos fibroblastos, sendo a quantidade de colágeno e outras proteínas sintetizadas consideravelmente maior, quando comparada aos fibroblastos controle.

Oikarinen et al. (1990), relataram que fibroblastos da FGH associados à deficiência de hormônio de crescimento, possuem taxa de crescimento menor comparado a fibroblatos controle, como descrito por Shirasuna et al. (1989). Em contraste, o nível de produção de mRNA para colágenos tipo I e III foi menor nos fibroblastos da FGH. Sendo assim, foi sugerido que o acúmulo de colágeno poderia ser decorrente de uma redução na atividade enzimática das

colagenases, ou poderia ser decorrente de um aumento nos níveis extracelulares de TIMPs, os principais inibidores extracelulares do catabolismo do colágeno (Oikarinen et al., 1990). Inconsistência nas descrições dos fibroblastos da FGH podem ser devido a heterogeneidade genética da doença e diferenças funcionais em fibroblastos oriundos de diferentes fibroses gengivais (Hassell e Stanek, 1983).

Aumento na capacidade proliferativa de fibroblastos podem contribuir para o aumento gengival observado na FGH, devido a uma maior atividade sintética de maior número de células no tecido (Coletta, 1999). Deposição elevada de colágeno é vista na maioria dos tecidos fibróticos, sendo importante determinar se é decorrente de aumento na produção de colágeno e outras macromoléculas da MEC ou diminuição na degradação das mesmas.

Os altos níveis de fibronectina produzidos por fibroblastos de FGH podem contribuir para o aumento clínico gengival. Além disso, fibronectina é um quimioatraente para fibroblastos. Tipton et al. (1997), mostraram uma proliferação mais rápida dos fibroblastos e uma síntese aumentada de colágeno e fibronectina em células de FGH, comparadas a células de gengiva normal, o que foi ratificado em um estudo com quatro diferentes linhagens de fibroblastos de FGH, utilizando diferentes marcadores de proliferação celular (Coletta et al., 1998).

Embora tenha sido descrito que a excessiva produção de TGF- β controla a síntese de colágeno e fibronectina em FGH, o mecanismo responsável pelo acúmulo de colágeno, ainda permanece desconhecido (Tipton e Dabbous, 1998). TGF- β , não só aumenta a síntese de macromoléculas da MEC, mas também inibe a expressão de colagenase (Edwards et al., 1987).

Segundo alguns autores, o tipo e a relação estequiométrica das moléculas de colágeno são as mesmas em gengiva normal, FGH e aumentos gengivais induzidos por medicamentos (Becker et al., 1967; Jonhson et al., 1986).

Trabalhos recentes, tem demonstrado em cultura de células uma produção e expressão reduzidas de MMP-1 e MMP-2 em fibroblastos da FGH, comparado a fibroblastos controle. Entretanto, os níveis de TIMP-1 e TIMP-2 não foram alterados nas mesmas culturas avaliadas (Coletta et al., 2000a).

Tabela 1. Principais síndromes associadas a FGH

Síndrome	Herança	Principais características além da FGH
Murray-Puretic-Drescher	AR	Múltiplos fibromas hialinos de cabeça e pescoço; defeitos osteolíticos das falanges terminais; infecções recorrentes
Rutheford	AD	Opacidade da córnea; retardo na erupção dental
Zimmermam-Laband	AD	Displasia de orelhas, nariz e unhas; hepatoesplenomegalia; hiperflexibilidade das articulações
Jones	AR	Surdez progressiva
Cross	AR	Oligofrenia; microftalmia; hipopigmentação dérmica
Cowden	AR	Fibroadenoma gigante de mama; hipertricose; múltiplos hamartomas
Fibromatose Gengival	AD/AR	Hipertricose; retardo mental; epilepsia
Síndrome de Hurler	AR	Baixa estatura; características faciais grosseiras; retardo psicomotor

Adaptado de Bakeen e Scully (1991) e Gorlin et al. (1990)

AR - Autossômica Recessiva

AD - Autossômica Dominante

5.2-*Chaperones* moleculares e proteínas de choque térmico

A conformação estrutural das proteínas depende, entre vários fatores, da participação de um grupo de proteínas com atividade catalisadora, denominadas *chaperones* ou proteínas que se ligam a cadeias peptídicas nascentes. Estas proteínas ligam-se a peptídeos em formação, tão logo começa a síntese protéica propriamente dita com a deposição de aminoácidos nos ribossomos, sem detectar qualquer sequência específica. Estas *chaperones* agem facilitando a aquisição da estrutura terciária e polimerização das estruturas monoméricas e prevenindo a secreção de proteínas mal formadas, assegurando que estes eventos ocorram com alta fidelidade (Hass e Wabl, 1983; Dorner et al., 1987; Kassenbrock et al., 1988; Flynn et al., 1989; De Silva et al., 1990, 1993; Gething e Sambrook, 1992).

A denominação *chaperone* foi inicialmente usada para descrever a proteína nucleoplasmina, uma proteína nuclear com função organizadora de DNA e de histonas, formando a estrutura dos nucleossomos em *Xenopus* (Laskey et al., 1978). Estes autores também demonstraram que a nucleoplasmina não interage com o DNA, mas interage com as histonas promovendo mudanças eletrostáticas que resultam na estruturação dos nucleossomos. O termo *chaperone* é apropriado, pois a nucleoplasmina interage com as histonas reduzindo a repulsão eletrostática entre elas, atuando na organização dos nucleossomos. Proteínas *chaperones*, são atualmente descritas como uma classe de proteínas capazes de associar e dissociar de forma transitória a porções hidrófobas das cadeias nascentes de polipeptídeos em processos de aquisição de estrutura terciária e polimerização e ainda, a proteínas que falham em se empacotar corretamente ou em se agregar em complexos oligoméricos essenciais (Hurtley e Helenius, 1989). Alguns

membros apenas se expressam em condições de estresse celular, enquanto outros são sintetizados constitutivamente.

A descoberta de que a translocação e empacotamento de certas proteínas recém formadas depende de *chaperones*, forneceu uma luz que pode explicar, por exemplo, como moléculas de pró-colágeno são eficientemente polimerizadas. Embora as *chaperones* não forneçam informações diretas para empacotamento e polimerização, elas possivelmente facilitam estes processos (Lippincott-Schwartz et al., 1988).

As *chaperones* residentes no RE, ligam-se a proteínas secretórias quando estas se encontram transpassando a membrana do RE, e permanecem ligadas até chegar no compartimento intermediário entre o RE e o aparelho de Golgi. Neste compartimento intermediário estas moléculas *chaperones* desligam-se da proteína secretória e retornam a membrana do RE para se ligar a outras proteínas. A dissociação da *chaperone* do substrato é promovida por uma modificação conformacional da molécula do substrato acompanhada da hidrólise de ATP/GTP ou por uma mudança de pH dentro do compartimento local (Pelham, 1989; Langer et al., 1992).

Uma visão integrada das funções das diferentes famílias de *chaperones* no empacotamento de proteínas tem sido descritos. Os mecanismos e as associações das moléculas *chaperones* foram demonstrados em *Escherichia coli* (Langer et al., 1992). Nesse sistema, acredita-se que DnaK (Hsp 70) reconheça o empacotamento de polipeptídeos como cadeias estendidas e coopere com DnaJ, uma proteína acessória do citosol, em estabilizar uma conformação intermediária sem ainda a obtenção de uma estrutura terciária organizada. Em um processo dependente da hidrólise de ATP, a proteína é

então transferida para GroEL (Hsp60), que atua cataliticamente na produção de um estado nativo da proteína (Langer et al., 1992).

Uma grande variedade de proteínas, como receptores da membrana plasmática, glicoproteínas de envelope viral, complexo de canais de íons, cadeias pesadas de miosina muscular, proteínas de citoesqueleto e moléculas de colágeno, existem como complexos multiméricos ou como heteropolímeros (Lippincott-Schwartz et al., 1988). Subunidades individuais destes complexos são sintetizadas em ribossomos associados ao RE. As proteínas são então inseridas dentro do RE durante e imediatamente após a síntese. Essas proteínas são a seguir alteradas, recebendo empacotamento extensivo, formação de pontes de dissulfeto e glicosilação. Proteínas que falham em executar estes passos, ligam-se de forma estável a *chaperones* e não são liberadas do RE (Hurtley e Helenius, 1989). Para manter a homeostase, as proteínas retidas no RE são degradadas por enzimas não-lisossomais, localizadas em compartimentos do RE (Langer et al., 1992).

Células procarióticas e eucarióticas expostas a temperaturas elevadas e outros estresses ambientais apresentam uma resposta fisiológica característica denominada resposta a choque térmico, ocorrendo a ativação de uma pequena, porém altamente conservada família de genes e a síntese de um grupo específico de proteínas, que foram denominadas proteínas de choque térmico, Hsps (Tissieres et al., 1974; Morimoto et al., 1994). Esta resposta foi descrita inicialmente, devido a alterações nos cromossomos de *Drosófilas* após estímulo térmico (Ritossa, 1962). A família de Hsps representa o principal mecanismo intrínseco celular de proteção à estímulos agressivos, sendo que a expressão dos genes de choque térmico durante o desenvolvimento embrionário tem sido amplamente estudada (Hightower, 1991; Heikkila,

1993a,b; Morange, 1997). A família de Hsps é formada por glicoproteínas com peso molecular variando entre 8 e 170 kDa, sendo que muitas apresentam níveis basais de expressão e funções essenciais em condições de homeostasia (Sens et al., 1997).

Em condições de homeostasia e estresse, Hsps estão implicadas na interação proteína-proteína, incluindo por exemplo, síntese e translocação de proteínas, aquisição e estabilização da estrutura terciária, prevenção de agregação e secreção protéica (Ang et al., 1991). Hsps também participam de outras funções celulares, como a tradução de sinais (Ciocca et al., 1993), replicação de DNA (Echols, 1990), proliferação (Georgopoulos e Welch, 1993) e degradação protéica (Hayes e Dice, 1996).

Em condições de estresse celular, as Hsps são capazes de atenuar e em muitas ocasiões, reverter o quadro de injúria celular. Quando ativados, os genes de choque térmico apresentam a capacidade de reprogramar muitas atividades celulares, tornando as células capazes de resistir ou reverter um quadro de injúria (Krone et al., 1997). Em condições patológicas a capacidade da célula em resistir a variadas formas de agressão está relacionada ao aumento na expressão de Hsps.

Trabalhos recentes tem demonstrado a possível participação das Hsps na eliminação de células neoplásicas. Estudos baseados na imunoterapia de ratos apresentando neoplasias malignas espontâneas e induzidas quimicamente, tratados com preparações de Hsps (Hsp70, Hsp90 e Grp94) derivadas de cânceres autólogos resultaram em um retardo na progressão da neoplasia, redução no número de metástases e prolongação da vida média do animal (Unodo et al., 1994; Tamura et al., 1997). Os mecanismos

apresentados pelas Hsps na terapia de neoplasias malignas são ainda desconhecidos.

Respostas celulares ao choque térmico são imediatas e complexas, transitórias, dependentes de ATP, envolvendo associação e dissociação de proteínas, sendo caracterizada por induzir níveis aumentados de Hsps e bloqueio na síntese de proteínas normais (Schlesinger, 1986; Langer et al., 1992). Quase todos os organismos vivos estudados respondem a elevação de temperatura por indução das Hsps, porém uma grande variedade de estresse fisiológicos ou não, como: processos inflamatórios, radicais livres, infecções virais, anóxia, isquemia, intoxicação mitocondrial, metais pesados, alterações de pH, inibidores de glicosilação e do metabolismo energético e presença de substâncias químicas como etanol, nicotina, anestésico, brefeldina A e cálcio ionofore, também são capazes de estimular resposta ao choque térmico (Kim et al., 1983; Bond e Schlesinger, 1985; Hightower, 1991). Em vista disto, foi sugerido para este grupo de proteínas um nome mais amplo, proteínas de resposta ao estresse, sendo que as principais famílias de *chaperones* (Hsp70, Hsp90 e Hsp47) fazem parte das Hsps.

Proteínas da família Hsp90 constituem as proteínas de estresse mais abundantes em eucarióticos, sendo as mais conservadas entre todas as classes de Hsps (Mazzarella e Green, 1987; Nakai et al., 1992; Jakob e Burchner, 1994).

A diversificação dos genes da família Hsp90 em eucariontes produz duas proteínas; a primeira localizada no citosol celular e denominada Hsp90 e a outra associada ao RE e denominada Grp94. A proteína citosólica, Hsp90 é menor que a proteína do RE e atua *in vitro* como uma proteína *chaperone* prevenindo a formação de agregados de proteínas desnaturadas (Freeman e

Morimoto, 1996). A principal função de Hsp90 *in vivo*, parece ser na maturação de proteínas que participam da regulação gênica e dos sinais de transcrição (Rutherford e Zurker, 1994). Hsp90 está associada a diversas proteínas celulares, como receptores de estrogênio, progesterona, glicocorticóides e mineralocorticóides (Caplan et al., 1994).

A proteína maior, Grp94, associada ao RE, apresenta em análises de SDS-PAGE, um peso molecular entre 94 a 108 kDa. Esta proteína, também é denominada endoplasmína (Koch et al., 1986), sendo induzida em condições de privação de glicose. Devido a isto, Grp94 tem sido designado a mesma o nome de proteína regulada por glicose. Grp94 é expressa em condições normais de crescimento, não sendo significativamente induzida por estímulos térmicos (Schlesinger, 1986). A exata função da Grp94 permanece desconhecida, sendo proposto que sua ação facilite a conformação e transporte de polipeptídeos do RE ao aparelho de Golgi e evite a secreção de proteínas incorretamente formadas. A associação de Grp94 na maturação e transporte de cadeias nascentes de colágeno I e IV foi proposta em diversos trabalhos (Sauk et al., 1994; Ferreira et al., 1994; Smith et al., 1995; Ferreira et al., 1996). Estes trabalhos sugerem que Grp94 é constitutivamente expressa na célula e que heterocomplexos, associação de Grp94, Grp78 e Hsp47, são formados durante a síntese de colágenos tipo I e IV.

A família Hsp70 tem sido a mais estudada das Hsps. Membros desta família estão presentes em todos os compartimentos intracelulares e participam ativamente de eventos de empacotamento e translocação dentro destes locais, como por exemplo, nas mitocôndrias, citosol e RE (Morimoto et al., 1994).

A classe da Hsp70 em humanos é formada por no mínimo quatro membros, com estruturas similares, sendo que três destes (Hsc73, Grp78 e Grp75) são expressos de forma constitutiva, enquanto que Hsp70 somente é expressa em condições de estresse celular.

Hsp70 apresenta funções essenciais como: manutenção de peptídeos nascentes no estado de estrutura primária, associação a outras proteínas *chaperones* na maturação de peptídeos e auxílio à distribuição de proteínas para as mitocôndrias, RE e núcleo (Zimmerman et al., 1988; Chirico et al., 1988; Philips e Silhavy, 1990; Beckmann et al., 1990; Sheffield et al., 1990; Shi e Thomas, 1992).

Grp78 localiza exclusivamente no lúmen do RE de células secretoras, sendo sua expressão aumentada em condições de privação de glicose (Munro e Pelham, 1986). Como outras proteínas residentes do RE, participa da estruturação de proteínas recém-sintetizadas e na identificação, retenção e degradação de proteínas alteradas (Chessler e Byers, 1993).

Chessler e Byers (1993), estudando 20 casos de osteogênese imperfeita, doença causada por mutações nos genes das cadeias α do colágeno tipo I, encontraram que três casos apresentavam aumento nos níveis de Grp78. Nos três casos a mutação resultava em cadeias $\alpha 1$ incapazes de associarem entre si e com cadeias $\alpha 2$, portanto incapazes de serem sintetizadas.

Vários estudos tem evidenciado a existência de um sistema proteolítico associado ao RE, que funciona independente e com a mesma qualidade do sistema lisossomal, onde Grp78 é o principal componente (Klausner e Sitia, 1990; Davis e Mechan, 1996), sendo que este sistema parece responsável pela degradação de proteínas desnaturadas e malformadas tão bem quanto do excesso de subunidades de proteínas oligoméricas (Klausner et al., 1990).

5.2.1-Hsp47

Hsp47, uma proteína residente no RE, tem sido colocada na função principal de *chaperone*, garantindo assim a produção de colágeno I heterotrimérico (Ferreira et al., 1996). Esta *chaperone* é expressa constitutivamente e também afetada por estresse ambientais, como elevação de temperatura (Nagata et al., 1986, Nagata et al., 1988). Hsp47 foi inicialmente descrita como uma glicoproteína em células endodérmicas de camundongo, sendo capaz de ligar-se a gelatina (Kurkinen et al., 1984). Esta proteína também é denominada coligina, por se ligar a vários tipos de colágeno (Taylor et al., 1985; Saga et al., 1987).

Esta glicoproteína de 47kDa liga-se exclusivamente a cadeias nascentes de colágeno tipos I, II, III, IV e V (Sauk et al., 1994; Nagata et al., 1986; Satoh et al., 1996), desse modo detectada em células secretoras de colágeno. A presença de Hsp47 tem sido demonstrada através de imunohistoquímica em fibroblastos e células musculares lisas, não sendo porém detectada em hepatócitos, epitélio de ductos biliares e endotélio sinusoidal (Saga et al., 1987). Em cultura de células, linhagens de fibroblastos BALB/3T3 expressam Hsp47, enquanto linhagens de células neuronais e leucêmicas não expressam (Nakai et al., 1992).

Adicionalmente, foi demonstrado que a produção de Hsp47 é diminuída em fibroblatos de embriões de galinha transformados pelo vírus do Sarcoma Rous (Nagata e Yamada, 1986) e em células BALB/3T3 transformadas pelo SV40 (Nakai et al., 1990). Porém, os níveis de Hsp47 são aumentados durante a diferenciação de células F9 (Takechi et al., 1992; Ferreira., 1996). Células primitivas F9 são induzidas a diferenciar em células viscerais na presença do

ácido retinóico ou pela combinação de ácido retinóico e dibutiridil AMPcíclico. Quando diferenciadas, estas células são capazes de produzir grandes quantidades de colágeno tipo IV (Strickland e Mahdavi, 1978; Ferreira et al., 1996). É interessante observar que células indiferenciadas mostraram pouca expressão de Hsp47, mas quando diferenciadas, a produção de Hsp47 foi significativamente aumentada (Ferreira et al., 1996). Clarke et al. (1993) e Yamamura et al. (1998) demonstraram a indução de Hsp47 como consequência do aumento na expressão de colágeno após tratamento de linhagens celulares de mioblastos e osteoblastos com TGF- β . A produção de Hsp47 está associada intimamente com a síntese de colágeno em fibroblastos que produzem quantidades variadas de colágeno (Sauk et al., 1990).

Estudos tem evidenciado que Hsp47 é um mediador importante na polimerização de pró-colágeno (Sauk et al., 1994; Ferreira et al., 1996) ligando-se a região amino-propeptídica das cadeias pró- α 1 num estágio pré-maturo de translocação, provavelmente após a inserção das cadeias no RE. A natureza polivalente de Hsp47 sugere que a mesma tenha função crítica na seleção das cadeias. Entretanto, com a polimerização das cadeias de colágeno, Hsp47 dissocia-se da região amino-terminal e as moléculas já polimerizadas são transportadas para o aparelho de Golgi e então secretadas. Desse modo, é provável que Hsp47 execute uma importante função em inibir o empacotamento pré-maturo das cadeias de colágeno e facilite a seleção da cadeia apropriada. Na presença de quantidades diminuídas ou na ausência de Hsp47, moléculas existentes como cadeias nascentes empacotam-se de forma incorreta e são degradadas por um mecanismo não-lisossomal. Hsp47 provavelmente determina o estado de oligomerização do colágeno tipo I, determinando o destino destas moléculas (Ferreira et al., 1996).

A associação de Hsp47 e pró-colágeno *in vitro* foi demonstrada por imunoprecipitação usando anticorpos anti-Hsp47 (Nakai et al., 1992) e, que a ligação desta *chaperone* a pró-colágeno seja transitória e a separação da mesma ocorra antes do pró-colágeno ser secretado. Quando as células são submetidas a estímulos térmicos ou tratamento com α,α' -dipiridil, um quelante iônico, que inibe a formação da tripla hélice de pró-colágeno, sendo que estas conformações anormais são vistas em associação com Hsp47 e permanecem no RE por um período de tempo maior (Nakai et al., 1992). As constantes de dissociação de Hsp47 com colágenos tipos I-V variam entre 10^{-6} a 10^{-7} M. Possivelmente esta baixa afinidade a pró-colágeno seja necessária para uma rápida associação e dissociação durante os processos de formação e transporte de moléculas em direção ao aparelho de Golgi (Natsume et al. 1994).

A ligação Hsp47 e pró-colágeno é resistente a presença de solução aquosa de 2M NaCl, mas é completamente rompida *in vitro* quando o pH do tampão é alterado para níveis inferiores a 6,3 (Saga et al., 1987). Estudos de Satoh et al. (1996), usando inibição por brefeldina demonstram que a dissociação Hsp47-pró-colágeno provavelmente ocorra nos compartimentos *cis* do aparelho de Golgi. Shroff et al. (1993) demonstraram a presença de Hsp47 nos compartimentos intermediários entre o RE e o aparelho de Golgi. É proposto que, após dissociação da molécula de tropocolágeno via provavelmente acidificação do pH, Hsp47 recicle para o RE por um processo envolvendo a sequência KDEL e receptores erd2P (Nagata, 1996)

A clonagem e o sequenciamento de Hsp47 em humanos, camundongos e galinhas demonstraram uma sequência sinal na porção N-terminal e um sinal de retenção no RE, na porção C-terminal, denominado RDEL (Arg-Asp-Glu-

Leu). A presença destes sinais confirmam que Hsp47 é uma proteína residente do RE (Takechi et al., 1992). Contudo, recentemente foi demonstrado que em condições de estresse celular como redução do pH, Hsp47 é expressa em associação com o receptor para a sequência KDEL (Lis-Asp-Glu-Leu) na superfície celular (Sauk et al., 1998). Uma possível função para esta expressão ainda é desconhecida.

Hsp47 tem sido relacionada a uma série de alterações fibróticas, as quais tem demonstrado um aumento na expressão de Hsp47 paralelamente a progressão destas doenças, tanto em modelos humanos, como em modelos animais (Razzaque e Taguchi, 1999). Kuroda et al. (1998) estudando culturas de fibroblastos da pele de nove pacientes portadores de esclerose sistêmica, doença do tecido conjuntivo caracterizada por fibrose da pele, tecidos subcutâneos e vários órgãos internos, com acúmulo excessivo de componentes da MEC, predominantemente colágeno tipo I e III, observaram um aumento nos níveis de Hsp47 mRNA e proteínas nos fibroblastos da esclerose sistêmica, quando comparado a fibroblastos de pele normal. Estas culturas de fibroblastos da esclerose sistêmica mostraram também expressão acentuada de pró-colágeno tipo I. Os autores investigaram, ainda, o efeito de citocinas na expressão de Hsp47 nas culturas de fibroblastos normais. TGF- β 1 e IL-4 aumentaram os níveis de Hsp47 mRNA, enquanto interferon- γ reduziu a expressão de Hsp47. O mesmo padrão das citocinas na expressão dos níveis de pró-colágeno I foram observados. Estes resultados indicam que a expressão de Hsp47 esta aumentada podendo estar envolvida na produção abundante de pró-colágeno I em fibroblastos de esclerose sistêmica.

Kojima et al. (1998) estudando a expressão de Hsp47 em osteogênese imperfeita, notaram um aumento desta *chaperone* comparado a fibroblastos

normais. O aumento de Hsp47 em fibroblastos alterados pode ser resultado da retenção de pró-colágenos anormais no RE. O aumento na expressão de Hsp47 associada com a retenção de pró-colágeno no RE, sugere fortemente a ligação entre Hsp47 e pró-colágenos anormais nos fibroblastos da osteogênese imperfeita.

Maior expressão de Hsp47 foi, ainda, observada em fibroblastos da pele submetidos a hipertermia e terapia fotodinâmica com riboflavina, comparado a fibroblastos normais (Verrico e Moore, 1997), sendo também verificado a co-expressão de Hsp47 e colágeno durante o desenvolvimento de molares de rato, onde odontoblastos e células do folículo dental produzem grandes quantidades de colágeno (Shroff et al., 1994a,b). Outros estudos tem confirmado a expressão aumentada de Hsp47 em várias alterações fibróticas renais (Razzaque e Taguchi, 1997). As alterações na produção de Hsp47 relatadas nestes estudos são consistentes com mudanças na produção de moléculas de colágeno, possibilitando concluir que a expressão de Hsp47 é diretamente regulada por colágeno.

Em contraste, Hsp47 é induzida por estímulos térmicos ou outras formas de estresse celular. Após condições de estresse, os níveis de Hsp47 são rapidamente elevados, enquanto os de colágeno permanecem inalterados. Isto sugere que nestas condições, a indução de Hsp47 ocorre principalmente via sistema elemento-fator de choque térmico, sendo que outras vias de indução não podem ser excluídas.

As funções de Hsp47 em estresse celular ainda não são bem entendidas. Alguns autores especulam que uma de suas funções principais é de ligar a moléculas de colágeno prevenindo a desnaturação e degradação. Kudo et al. (1994) demonstraram níveis aumentados de Hsp47 em fibroblastos alterados

por choque térmico. Jain et al. (1994) encontraram resultados similares, sugerindo que a expressão alterada de Hsp47 preveniria a degradação de pró-colágeno no RE. A participação de Hsp47 também foi demonstrada em processos de alteração de colágeno, com substâncias químicas, hipertermia, terapia fotodinâmica com riboflavina (Verrico e Moore, 1997).

Em células normais, Hsp47 participa da maturação e transporte de pró-colágeno, estando localizada, principalmente, no RE. Recentemente, contudo, foi demonstrado que Hsp47 é expressa na superfície celular de tumores bem diferenciados (Morino et al., 1997) e ancorada na superfície celular de linhagens celulares provenientes de carcinomas espinocelulares de boca em associação com CD9 (Hebert et al., 1999). Este complexo modula a motilidade e invasão celular, agindo, provavelmente, como um receptor colagênico. A relação de Hsp47 e superfície celular de tumores malignos é ainda incerta, porém propicia perspectivas na terapia destas neoplasias, uma vez que a expressão de Hsp47 na superfície celular é exclusiva de células malignas.

Algumas características estudadas distinguem Hsp47 de outras *chaperones*, como: a sua especificidade à moléculas de colágeno, enquanto outras *chaperones* não possuem qualquer afinidade a um substrato, dissociação de moléculas de colágeno em meios ácidos, não apresenta afinidade à moléculas de ATP, ponto isoelétrico incomum (pI=9,0) e ligação a gelatina (Kurkinen et al., 1984; Nakai et al., 1989). Além de ser uma proteína altamente glicosilada, onde a porção oligossacarídica constitui cerca de 10 a 15% de seu peso molecular. Hsp47 possui também uma estrutura rica em polissacarídeos, com grande quantidade de unidades de manose (Hughes et al., 1987).

As proteínas descritas na literatura apresentando características de Hsps e *chaperones* estão descritas na tabela 2.

Tabela 2. Principais Hsps que atuam como *chaperones* e respectivas funções.

Proteína	Função
Nucleoplasmina	Organização/desorganização de nucleossomos
SecB	Transporte de peptídeos
PapD	Organização do pilus bacteriano
PrtM	Conformação de proteínas bacterianas
PrsA	Conformação de proteínas bacterianas
Lim	Conformação da lipase bacteriana
GrpE	Interação com DnaK em <i>E. coli</i>
P22	Organização e desorganização da parede bacteriana
SRP	Transporte de peptídeos
Pro-sequences	Conformação de proteases
Rb	Ligação a fatores de transcrição
DnaJ/Hsp40 bacteriana	Interação com Hsp70 em leveduras
Hsp47	Conformação e transporte de colágeno
	Degradação de proteínas no RE
GroEL/Hsp60 bacteriana	Conformação e transporte de proteínas
Hsp60	Conformação e transporte de peptídeos nas mitocôndrias
DnaK/Hsp70 bacteriana	Conformação e transporte de peptídeos em eucariotos e procariotos
Grp75	Conformação e transporte de peptídeos em mitocôndrias
Grp78	Conformação e transporte de peptídeos no RE
	Degradação de proteínas no RE
Hsp90	Conformação e transporte de peptídeos
Grp94	Conformação e transporte de peptídeos no RE
Hsp104	Dissociação de agregados protéicos
Hsp10	Auxilia Hsp60 na conformação e transporte de peptídeos nas mitocôndrias

Adaptado de Coletta (1999).

5.3-Colágeno

Colágeno compõe uma família de proteínas fibrosas encontradas em todos os organismos multicelulares (Linsenmayer, 1981). Esta proteína é

secretada por células do tecido conjuntivo e constituindo a proteína mais abundante de mamíferos. O colágeno representa aproximadamente 25% do total de proteínas em um organismo (Burgeson, 1988). A principal e mais frequente característica das moléculas de colágeno é a estrutura firme de hélice tríplice. Três cadeias de polipeptídeos de colágeno, chamadas de cadeias α (cada uma de 1000 aminoácidos), são entrelaçadas entre elas numa configuração de super-hélice formando uma molécula de colágeno fibrilar com aproximadamente 300nm de comprimento e 1,5nm de diâmetro.

Vinte tipos distintos de moléculas de colágeno já foram descritas. As moléculas dos diferentes tipos de colágeno são formadas por combinações de vinte e cinco diferentes tipos de cadeias α , cada qual codificada por um gene distinto. Combinações diferentes desses genes são expressas em diferentes tecidos. Os colágenos melhor descritos e mais frequentes são os tipos I, II, III e IV. Os tipos I, II e III são colágenos fibrilares e constituem os principais colágenos encontrados no tecido conjuntivo, sendo o tipo I o mais comum (Darnell e Lodish, 1986). Após serem secretados no espaço extracelular, estes três tipos de colágeno se polimerizam em estruturas organizadas denominadas de fibrilas. As fibrilas de colágeno são estruturas finas (10-300nm de diâmetro) e claramente visíveis no microscópio eletrônico (Darnell e Lodish, 1986). As fibrilas de colágeno frequentemente se agregam em estruturas maiores conhecidas como fibras de colágeno. As moléculas de colágeno tipo IV são encontradas predominantemente na lâmina basal, e ao contrário dos colágenos fibrilares não formam fibrilas, mas sim uma mecha de rede que constitui o componente principal da lâmina basal (Timpl, 1989).

O colágeno tipo I é uma molécula heterotrimérica produzida por mRNAs individuais (Flug e Kopf-Maier, 1995). Este tipo é produzido

principalmente por células produtoras de matriz orgânica, como fibroblastos, osteoblastos e odontoblastos. As cadeias individuais de polipeptídeos de colágeno são produzidas como precursores chamados de pró- α -cadeias. O colágeno heterotrimérico tipo I é composto por duas cadeias pró- α I idênticas e uma cadeia distinta pró- α 2, fornecendo a seguinte estequiometria [2 pró- α 1 (1), 1 pró- α 2 (1)]. Cada cadeia pró- α do colágeno tipo I possui composição química rica em glicina, representando aproximadamente 30% do total de aminoácidos da molécula e peso molecular de 140 kDa. Além da alta concentração de glicina, as cadeias α apresentam em sua composição hidroxiprolina e hidroxilisina, que raramente são observados em outras proteínas. Esta composição é caracterizada pela repetição da fórmula trimérica Pro-X-Gly, sendo a presença de prolina e glicina fundamentais para estabilização da tríplice hélice. As cadeias do colágeno tipo I são secretadas no meio extra-celular na forma de pró-colágeno, contendo polipeptídeos N- e C- terminais que são removidos por enzimas específicas.

RNAs mensageiros de colágeno que codificam as cadeias pró- α 1 e pró- α 2 são levados ao retículo endoplasmático rugoso por mecanismos complexos de interações de proteínas que garantem a associação e processamento de pró-peptídeos de colágeno e a formação de heterotrímeros .

5.4-Tranlocação de Proteínas Através do Retículo Endoplasmático

5.4.1-Síntese Protéica

A célula eucariótica possui uma maquinaria desenvolvida, capaz de controlar a síntese protéica nos vários estágios. Os eventos envolvendo a produção de colágeno, bem como outras proteínas envolvem uma série de

interações bioquímicas e participação de proteínas *chaperones*, além de canais especializados na condução de proteínas situados no RE.

O eventos pós-traducionais são responsáveis pelo processamento, conformação e síntese, portanto, relacionados com a organização e função das proteínas. Os eventos pós-traducionais da síntese protéica iniciam no citosol, e em células eucarióticas, o transporte de proteínas para o RE acontece antes que se complete a síntese da cadeia polipeptídica, ocorrendo assim, em uma etapa co-traducional. A síntese protéica nos polirribossomos aderidos ao RE caracteriza-se por injetar, para o interior das cisternas do RE, as cadeias polipeptídicas que assim ficam separadas do resto do citoplasma. Este processo de injeção das proteínas para o RE tem importância funcional para moléculas citosólicas que se destinam a certas organelas ou são exportadas para o meio extra-celular. O RE é ainda a organela onde muitas modificações pós-traducionais acontecem, incluindo a aquisição de estrutura terciária, formação de polímeros e glicosilação inicial.

A translocação de proteínas através da membrana do RE, envolve uma cascata de eventos, como o reconhecimento de precursores, ligação a membrana do RE e posterior entrada, ligação de proteínas *chaperones*, sinal de clivagem e o transporte para o aparelho de Golgi.

O reconhecimento de cadeias nascentes é mediado pela PRS, uma ribonucleoproteína de seis polipeptídeos, que conduz o peptídeo até a membrana do RE. A PRS desloca-se entre o RE e o citosol ligando as cadeias nascentes de proteínas, tão rápido quanto o peptídeo emerge dos ribossomos (Wolin, 1994). A ligação da PRS ao conjunto formado pelo ribossomo-cadeia nascente forma um complexo que é transportado em direção à membrana do RE onde se liga a um receptor de PRS. Este receptor representa uma proteína

transmembrânica, com sítios expostos ao citosol e o lúmen do RE (Gilmore, 1993). Após ativação do receptor e hidrólise de moléculas de GTP como fonte de energia, abre-se um canal protéico por onde a cadeia polipeptídica é introduzida no RE (Mothes et al., 1998; Rapoport et al., 1999). Além disso, proteínas *chaperones* contidas no RE estão provavelmente implicadas em eventos de maturação e translocação das proteínas (Ferreira, 1994). Estas proteínas residentes do RE participam ativamente na maturação protéica, bem como prevenindo agregação ou má formação das proteínas. Posteriormente as proteínas serão direcionadas para o aparelho de Golgi, onde poderão ter vários destinos, como: retornar ao RE, funcionando como uma proteína residente do mesmo, ficar como residente do aparelho de Golgi, ser conduzida para outras organelas, dirigir para a membrana celular, funcionando como um componente estrutural e/ou funcional ou ser secretada para o espaço extracelular.

Canais condutores de proteínas e Sec61 α

Além da presença de *chaperones*, proteínas secretórias, incluindo o colágeno, são transportadas através da membrana do RE por meio de canais associados ao RE especializados na condução de proteínas (Mothes et al., 1998; Rapoport et al., 1999). A existência destes canais mostram a presença de amplos poros condutores de íons com o interior hidrofílico, como determinado por medidas de fluorescência (Crowley et al., 1993). Este canal condutor de proteínas é constituído por um grupo de proteínas transmembrânicas que incluem TRAP (*translocon associated protein*), TRAM (*translocating chain-associating membrane protein*) e o complexo Sec61p. TRAM e o complexo Sec61p estão fortemente associados a ribossomos da membrana do RE,

sugerindo que cadeias nascentes de polipeptídeos passam por este canal indo para as cisternas do RE (Gorlich et al., 1992b).

O principal componente dos canais condutores de proteínas é o complexo SEC61p. Este complexo é homólogo ao SecYp, encontrado em bactérias (Stirling et al., 1992). O complexo Sec61p está localizado próximo aos polipeptídeos nascentes, durante a passagem destes pela membrana do RE. A reconstrução dos eventos de translocação em mamíferos, indicou que muitos polipeptídeos necessitam somente do complexo Sec61p e dos receptores PRS, enquanto outros polipeptídeos necessitam, ainda, do TRAM (Gorlich e Rapoport, 1993). O complexo Sec61p está fortemente associado com ribossomos após solubilização de microsomos e as condições necessárias para dissociação do complexo Sec61p-ribossomos, são as mesmas necessárias para separar os ribossomos da membrana, ou seja, altas concentrações salinas ou tratamento com puromicina (Gorlich et al., 1992b). Estes dados confirmam a participação do complexo Sec61p com a ligação de ribossomos a membrana do RE.

O RE possui um sistema de controle para proteínas mal formadas, sendo as mesmas rapidamente degradadas por um sistema proteolítico no citosol. Este transporte retrógrado de proteínas do RE para os lisossomos citosólicos, tem sido mostrado recentemente possuir como importante mediador o complexo Sec61p, entre outras proteínas (Simpson et al., 1999; Plemper et al., 1999).

O complexo Sec61p foi descrito inicialmente em *S. cerevisiae* (Stirling et al; 1992). Sec61p foi encontrado no RE e no compartimento intermediário entre o RE e o aparelho de Golgi, mostrando, assim, que os componentes dos canais condutores de proteína não são residentes permanentes do RE

(Greenfield e Highs, 1999). O complexo Sec61p é formado por três subunidades, α , β e γ (Greenfield e Highs, 1999) representadas pelo Sec61 α , Sec61 β e Sec61 γ , respectivamente.

Sec61 α é a maior (37-38 kDa) e mais importante proteína do complexo Sec61p, sendo considerada essencial para translocação de cadeias polipeptídicas, incluindo colágeno, através desse canal para as cisternas do RE.

O processo de translocação que requer a proteína Sec61 α em células de mamíferos, está associado com uma entrada co-traducional especializada, no qual peptídeos nascentes estão continuamente ligados a ribossomos durante a passagem através da membrana do RE (Jungnickel et al., 1994). Experimentos utilizando reagentes de reação cruzada demonstraram a intensa associação de Sec61 α com cadeias nascentes de polipeptídeos atravessando a membrana do RE (Mothes et al., 1988).

Sec61 α possui na sua composição aminoácidos hidrofílicos, que podem contribuir para a composição hidrofílica dos canais condutores de proteínas. A translocação de polipeptídeos pode estar ligada ao Sec61 α em diferentes estágios durante a passagem pela membrana do RE. O complexo Sec61p inclui, também, dois polipeptídeos de cerca de 14 e 8 kDa (subunidades β e γ , respectivamente). As subunidades β e γ do complexo Sec61p de mamíferos são pequenas proteínas de membrana que estão ancoradas à membrana do RE pela porção C-terminal (Gorlich et al., 1992b).

Ainda é incerto se Sec61 α é expressa constitutivamente e se é sintetizada em todas as células produtoras de colágeno. Além disso, também não está claro se a produção e utilização de Sec61 α é dependente do estágio

de diferenciação celular. Células F9 tratadas com ácido retinóico, resultaram em um aumento substancial de Hsp47, síntese de colágeno e Sec61 α comparado com células controle (Ferreira, 1995).

PROPOSIÇÃO

6 - PROPOSIÇÃO

O principal objetivo deste estudo foi determinar a síntese protéica de Hsp47 e Sec61 α em fibroblastos gengivais de FGH e de GN, durante os eventos de translação/translocação de colágeno tipo I, através de Western blot revelado por quimioluminescência em situações de homeostase e de estresse térmico.

MATERIAL E MÉTODO

7 - MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes

Para este estudo culturas primárias de fibroblastos de humanos foram estabelecidas. Dois tipos de células foram escolhidos: 1) fibroblastos gengivais de pacientes com FGH e 2) fibroblastos gengivais normais (GN) utilizados como células controle de pacientes sem FGH ou outra alteração sistêmica. Foram utilizados um total de 12 pacientes, sendo seis portadores de FGH e seis com GN, estabelecendo assim duas linhagens celulares. A tabela 3 mostra as informações clínicas dos pacientes utilizados neste estudo, incluindo sexo, idade e local de remoção do tecido gengival.

O tecido gengival de pacientes portadores de FGH, foram coletados durante procedimentos cirúrgicos periodontais (gengivectomias e gengivoplastias), realizados rotineiramente no Orocentro da Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Todos os pacientes da FGH foram de uma única família, e apenas selecionados os indivíduos com aumento gengival generalizado de aspecto fibrótico e sem sinais clínicos de inflamação. Os pacientes portadores de FGH apresentavam intelecto normal e não faziam uso de qualquer medicação relacionada a aumentos gengivais.

O tecido gengival normal foi obtido através de biópsias com *punch*, dois a três milímetros acima da margem gengival livre. Foram selecionados voluntários que apresentavam higiene oral satisfatória (índice de placa bacteriana menor que 30%), gengiva clinicamente normal, sem evidência clínica de inflamação ou aumento gengival. Houve um cuidado especial para que a FGH fosse a única variante nos dois grupos.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas relativas à ética em pesquisa envolvendo seres humanos - deliberação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas.

Tabela 3. Características clínicas dos pacientes dos quais foram estabelecidas as diferentes linhagens de cultura celular.

<i>Linhagem Celular</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Localização</i>
Controle			
GN1	F	29	13-14
GN3	M	26	13-14
GN5	M	20	13-14
GN6	F	19	13-14
GN7	F	23	14-15
GN8	M	23	37-38
FGH			
FGH1	M	20	18
FGH2	F	28	34-36
FGH3	M	22	13-23
FGH4	F	26	24
FGH6	F	14	13-23
FGH10	F	08	33-43

Cultura de células

As células foram obtidas através de procedimentos de cultura primária realizados pela disciplina de Patologia Oral. As linhagens de GN foram denominadas GN 1,3,5,6,7e 8 e as de FGH 1,2,3,4,6 e 10. Os fragmentos gengivais, além de serem encaminhados para o laboratório de Biologia Celular para estabelecimento de cultura de fibroblastos, foram submetidos a processamento histopatológico de rotina.

Os fragmentos gengivais coletados foram cortados em pedaços menores (aproximadamente 1 mm³), lavados várias vezes com solução salina balanceada Hank's e colocados em frascos de 25cm² contendo meio de cultura DMEM (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), 125mg/ml de garamicina, 50ng/ml anfotericina B, acrescido de 10% de soro fetal bovino (Cultilab Ltda, Campinas-SP). Após 15 dias a concentração de garamicina foi reduzida para 50mg/ml. Os frascos foram colocados em estufa à 37°C com 5% de CO₂ e o meio de cultura trocado a cada dois, até a cultura de fibroblastos predominar, sendo então transferidas para frascos de 75 cm² e marcado P1 (passagem 1).

Quando confluentes, as células foram subcultivadas. O meio de cultura é removido, as células lavadas com 5 ml de solução tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS), e então incubadas com 1 ml de tripisina à 0,2% por aproximadamente 5 min, ou até que as células ficassem separadas do assoalho do frasco de cultura determinado por microscópio de contraste de fase. Neste ponto a ação da tripisina foi interrompida pela adição de um volume igual de meio de cultura. A suspensão de células foi transferida para tubos cônicos de plástico de 15 ml, estéreis e centrifugados à 400x por 5 min. O sobrenadante foi removido e o *pellet* de células resuspendidos em 5 ml de meio de cultura. As células foram contadas e plaqueadas em frascos de 75 cm² a uma

concentração de aproximadamente 1×10^5 células em 10 ml de meio de cultura DMEM para manter as células crescendo. Alternativamente, algumas das células foram suspensas em meio contendo 10% (v/v) di-metil sulfoxido (DMSO, Sigma) e congelados a -170°C em nitrogênio líquido para uso posterior. Para descongelar as células os criotubos foram colocados em banho de água a 37°C e as células descongeladas rapidamente. As células foram, então, suspensas em 10 ml de meio de cultura e centrifugadas à 400x por 5 min. Depois da remoção do sobrenadante, as células foram resuspendidas em 10 ml de meio de cultura e colocadas em frascos de 75 cm^2 a uma concentração final de aproximadamente 1×10^5 células/frasco para realização dos experimentos. Foram utilizadas células entre a segunda e décima primeira passagens. Em todos os procedimentos de cultivo foram observados cuidados para a manutenção da esterelidade.

Anticorpos contra Hsp47 e Sec61 α

O anticorpo contra Hsp47 foi gentilmente cedido pelo Dr. J.J. Sauk (University of Maryland-USA). Este anticorpo foi preparado contra o 25-mer peptídeo sintético começando na porção N-terminal [VPSEDRKLSDKATTLADRSTTLAFNL] da sequência da proteína Hsp47 de galinha. A sequência foi obtida através da sequência direta da proteína isolada usando "*immobilon transfers*" de uma banda isolada que tinha sido previamente purificada por cromatografia de gelatina-Sepharose e por géis de poliacrilamida, seguindo o método de Matsufaira (1987) e Moos et al. (1988). O peptídeo sintético que constitui o antígeno para este anticorpo foi conjugado pela técnica de *Keyhole Limpid Hemocyanin* e anticorpos policlonais desenvolvidos em coelhos. Este antígeno compete com Hsp47 nativo para

ligação com a gelatina e o anticorpo resultante identifica Hsp47 humano em análise de Western blot. Este anticorpo reage com Hsp47 de fibroblasto gengival humano (Sauk et al., 1994). O anticorpo para Sec61 α representa um anticorpo monoclonal de rato anti-humano Sec61 α produzido pela Stressgen (Victoria, Canada), diluído 1:2000 em solução de PBS-azida sódica.

Gel de Eletroforese e Western blot

Fibroblastos de FGH e fibroblastos de GN foram coletados e incubados em tampão de lise (50mM Tris-HCl, pH 8 0,04 M NaCl 5mM EDTA) à 4°C por 30 min.

Proteína total do sobrenadante foi determinada pelo método de Bredford e concentrações protéicas iguais foram misturadas à tampão de amostra redutor (2% SDS, 125 mM Tris-HCl, pH 8, 10% glicerol, 0,001% azul de bromofenol, 2% β -mercaptoetanol), fervidas por 5 min e separadas eletroforéticamente em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) à 10% (Laemmli, 1970). Em seguida, o material eletroforizado foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (poro 0,45 μ m, Pharmacia). A membrana foi bloqueada com leite em pó desnatado (Néstle) em PBS, enxaguada três vezes com PBS, e incubadas por 16 h, à temperatura ambiente com anticorpos diluídos contra Hsp47 e Sec61 α (diluição 1:2000). A membrana foi lavada quatro vezes com PBS acrescido de 0,2% Tween 20 (Sigma) e incubada por 2h à temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado a enzima peroxidase e reveladas com quimioluminescência seguindo normas do fabricante (Amershan Inc.). A membrana foi envolta por plástico e exposta à filme radiográfico. Análise densitométrica foi realizada em um densitômetro modelo GS700 (Bio Rad).

Efeito do tratamento com calor

Fibroblastos foram mantidos em condições normais de cultivo (estufa à 37°C, atmosfera úmida a 5% CO₂) e em condições de estresse térmico (43°C por 1h). Os extratos lisados foram coletados por centrifugação e analisados por SDS-PAGE e Western blot.

Análise Estatística

A maioria dos experimentos forneceram resultados analíticos ou descritivos dos géis. Medidas densitométricas, utilizando-se de "*scanner/gel reader*" (Model GS-700 Imaging Densitometer-Bio Rad), das atividades sintéticas foram avaliadas e comparadas entre fibroblastos de FGH e fibroblastos de GN através de sistema de imagem. A significância estatística das diferenças destes efeitos foi determinada por uma análise de variância. Comparações *pairwise* entre a média das medições densitométricas nos dois tipos de células foram feitas através do teste de Student. Estatísticas descritivas como médias, desvios padrões e erros padrões foram gerados onde apropriados.

RESULTADOS

8 - RESULTADOS

Aspectos Clínicos e Histopatológicos

Os pacientes, afetados pela FGH, participantes deste estudo fazem parte de uma única família portadora de tal alteração que atualmente esta composta por 216 pessoas, sendo 96 afetados por FGH. O primeiro indivíduo a expressar o fenótipo era do sexo masculino, nascido em 1907. A família em questão vem sendo acompanhada pelo Departamento de Diagnóstico Oral desta Faculdade, há aproximadamente 20 anos, onde recebem, além do tratamento odontológico geral, o aconselhamento genético a respeito da condição hereditária.

Em todos os casos de FGH analisados, o aumento gengival foi fibrótico e generalizado, sendo as regiões de maior acometimento, os sítios anteriores inferiores e superiores (Fig. 1), que apresentaram um pontilhado superficial característico e ausência clínica de sinais inflamatórios, visto tanto na dentição decídua como na permanente.

O tecido coletado de pacientes voluntários com a GN, foi obtido através de biópsias com bisturi circular de 5mm (*Punch*), na maior parte das vezes, entre os dentes 13 e 14, dois a três milímetros acima da margem gengival livre (Fig. 2). Nos pacientes da FGH, o material foi removido durante procedimentos cirúrgicos, sendo parte do mesmo utilizado para estabelecimento de culturas e outra parte para análise histopatológica de rotina. Comparando com a gengiva de pacientes do grupo controle, a gengiva de portadores da FGH, apresentou um tecido conjuntivo denso fibroso, com numerosos feixes de fibras colágenas. O tecido epitelial apresentou-se

acantótico e hiperplásico com longas e delgadas e, muitas vezes, irregulares criptas epiteliais em direção ao conjuntivo subjacente (Fig. 3). As características histológicas foram similares para todos os seis membros da família estudada.

Aspectos Morfológicos das Células em Cultura

O material encaminhado para o laboratório de Biologia Celular foi utilizado para o estabelecimento de cultura de fibroblastos. Os fibroblastos da FGH apresentaram velocidade de crescimento maior que os fibroblastos da GN. Fibroblastos gengivais foram observados emergindo de todos os fragmentos de FGH em média após 20 dias do plaqueamento, e dos fragmentos de GN, em média, após 27 dias. Após 35 a 37 dias de cultura primária, mais de 90% dos frascos apresentavam-se preenchidos com fibroblastos de FGH, sendo então realizado a primeira subcultura. Por outro lado, a cultura de GN cresceu mais lentamente e a primeira subcultura só foi possível após 42 a 45 dias do início do cultivo. Tanto na cultura primária quanto nas subculturas, ficou evidente que os fibroblastos da FGH proliferaram mais rapidamente que fibroblastos da GN. Após a décima subcultura foi observado uma redução na velocidade de crescimento tanto nas células da FGH, como da GN, sendo então as culturas descartadas.

As células de FGH e GN, apesar da diferença de velocidade de crescimento, proliferaram em orientação paralela respeitando o espaço que normalmente deve existir entre membranas celulares e, em condições de confluência celular não foi percebido empilhamento, desorganização na distribuição ou morte celular. Morfologicamente, em condições de subconfluência celular, os fibroblastos de FGH e de GN foram similares.

Exibiram formato fusiforme, com núcleo central e típicos prolongamentos citoplasmáticos. Contudo, em condições de confluência celular, os fibroblastos da FGH demonstraram tamanho e largura menores que os fibroblastos da GN (Fig. 4).

Análise da Síntese Protéica de Hsp47

A associação de Hsp47 com colágeno foi verificada, utilizando doze linhagens celulares, sendo seis de FGH e seis de GN e analisadas em maiores detalhes pela técnica de Western blot por quimioluminescência (Fig. 5, painel superior). As canaletas de A-F representam as linhagens de GN, enquanto as canaletas de G-L representam as linhagens de FGH. Esta técnica revelou que a produção de Hsp47 foi mais acentuada nos fibroblastos de FGH, comparado a GN. A análise densitométrica do gel demonstrou que fibroblastos de FGH produziram aproximadamente 36,5% mais Hsp47 do que fibroblastos de GN, sendo que todas as linhagens de FGH produziram quantidades significativamente maiores de Hsp47 comparado a produção em fibroblastos de GN, $p < 0,01$ (Fig. 5, painel inferior).

Para determinar se Hsp47 está ou não aumentada em condições de estresse térmico (estímulo de temperatura), os mesmos experimentos de Western blot foram realizados, porém utilizando células em condições de homeostasia (incubadas à 37°C, atmosfera úmida à 5% de CO₂) e em condições de estímulo térmico (43°C por 1h). A fig. 6, painel superior, mostra o Western blot de duas linhagens celulares, onde as canaletas A e B, representam GN e FGH em condições homeostáticas, enquanto as canaletas C e D representam GN e FGH em condições de estímulo térmico. Em ambas situações, GN e FGH, verificamos aumento na produção de Hsp47 em células

submetidas a estímulos térmicos. Análise densitométrica do gel mostrou que a produção de Hsp47 foi em média 2,2 vezes maior em fibroblastos de FGH e 1,1 vez maior em fibroblastos de GN, após o estímulo térmico (Fig. 6, painel inferior).

Análise da Síntese Protéica de Sec61 α

O complexo Sec61p é o principal componente da translocação no RE. O complexo consiste de três subunidades: Sec61 α , Sec61 β e Sec61 γ , sendo que duas delas (α e β) são ligadas a proteínas nascentes durante sua inserção na membrana do RE. Sec61 α funciona como principal elemento deste canal transmembrânico. Este canal representa, assim, o principal sítio de translocação de proteínas secretórias, incluindo colágeno (Knight e High, 1998). Para avaliarmos se Sec61 α é produzido constitutivamente em células produtoras de colágeno, utilizamos culturas de fibroblastos e análise de Western blot em linhagens de fibroblastos de GN e de fibroblastos da FGH. A análise da produção de Sec61 α por fibroblastos da FGH e de GN pode ser visualizado na Fig. 7, painel superior. As canaletas A e B representam, respectivamente, a GN e FGH em condições de homeostasia (estufa 37⁰C, atmosfera úmida à 5% de CO₂). Verifica-se a presença de uma proteína de 37 kDa que corresponde a Sec61 α . Análises densitométricas deste experimento não verificaram diferenças estatisticamente significante na produção de Sec61 α entre fibroblastos de FGH e de GN (Fig. 7, painel inferior).

Para determinar o efeito de estresse térmico na produção de Sec61 α em fibroblastos de FGH e de GN, Western blot foi realizado (Fig.8, painel superior). As canaletas A e C representam, respectivamente, a GN em condições homeostáticas e de estímulo térmico (43⁰C por 1h), enquanto as

canaletas B e D representam, respectivamente, FGH em condições homeostáticas e de estímulo térmico. Análises densitométricas deste estudo (Fig. 8, painel inferior), não demonstraram diferenças estatísticas significantes na produção de Sec61 α entre as linhagens celulares avaliadas.

DISCUSSÃO



Fig.1. Aspecto clínico de paciente portador de FGH, participante deste estudo. Observa-se o aumento gengival generalizado, envolvendo todos os dentes. (x1/1,5)

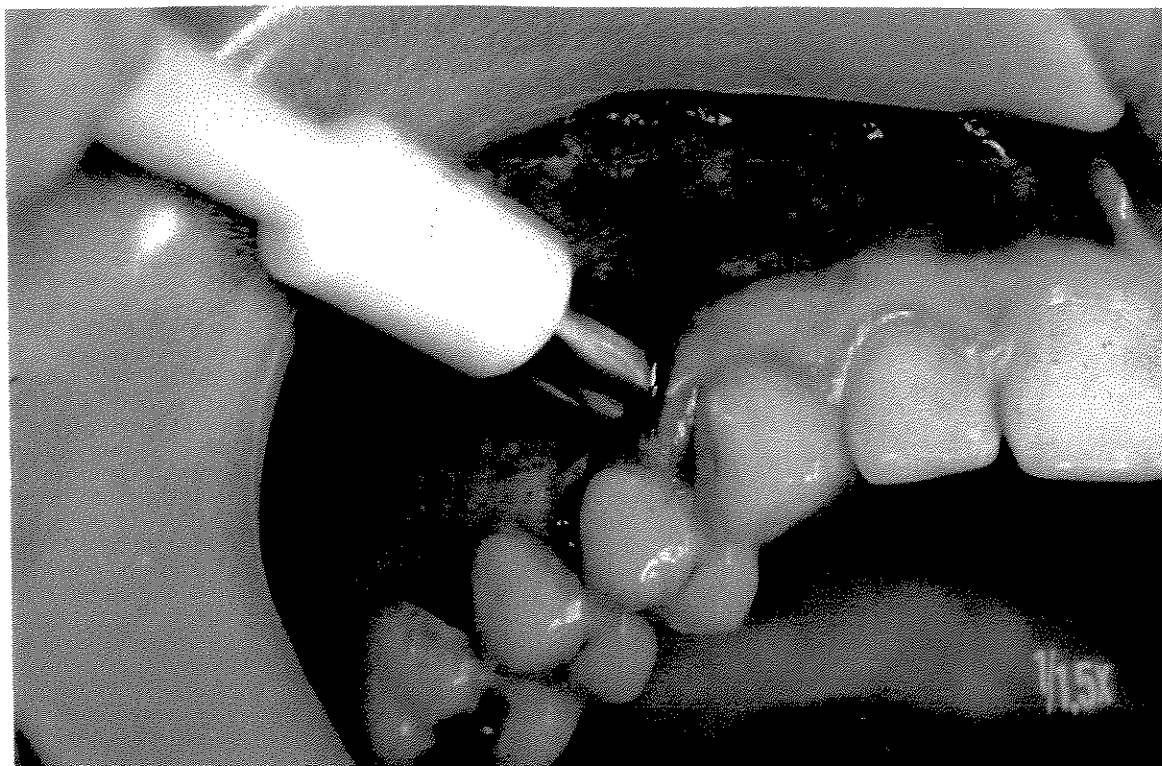


Fig.2. Procedimento de biópsia, com bisturi circular de 5mm (*punch*) de GN. O procedimento foi realizado dois a três milímetros acima da margem gengival livre, entre o canino e primeiro pré-molar superior direito. (x1/1,5)

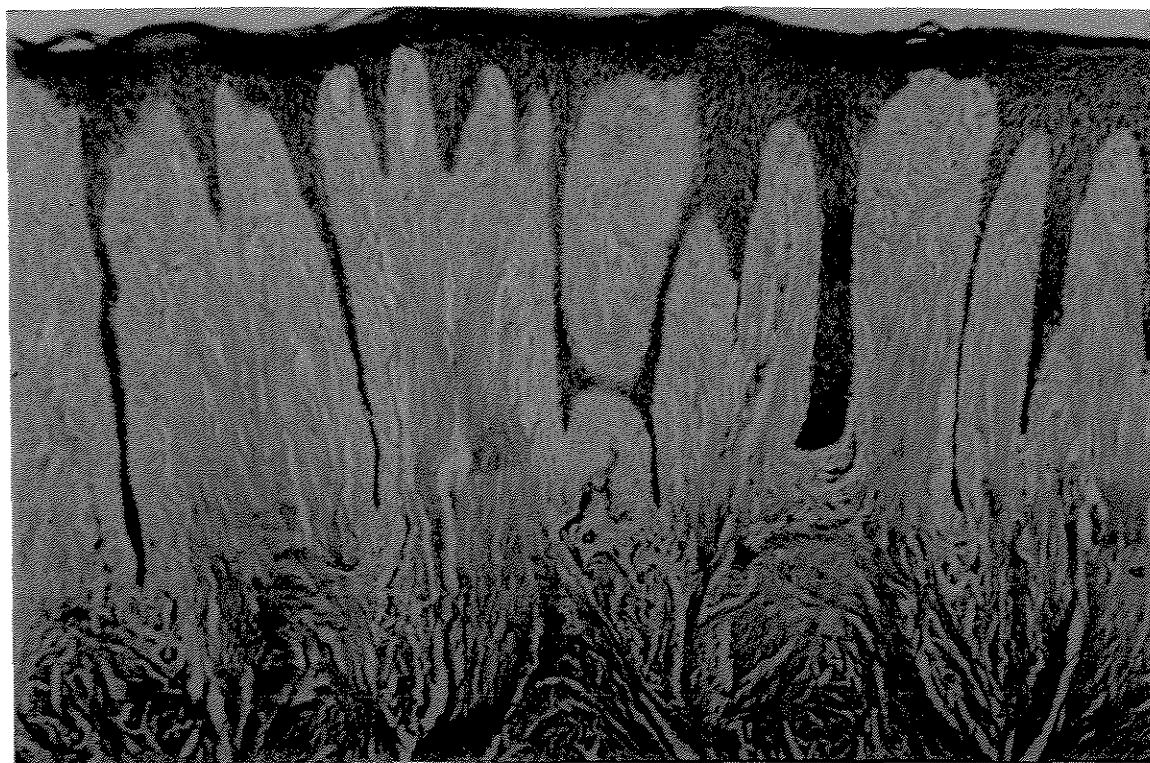
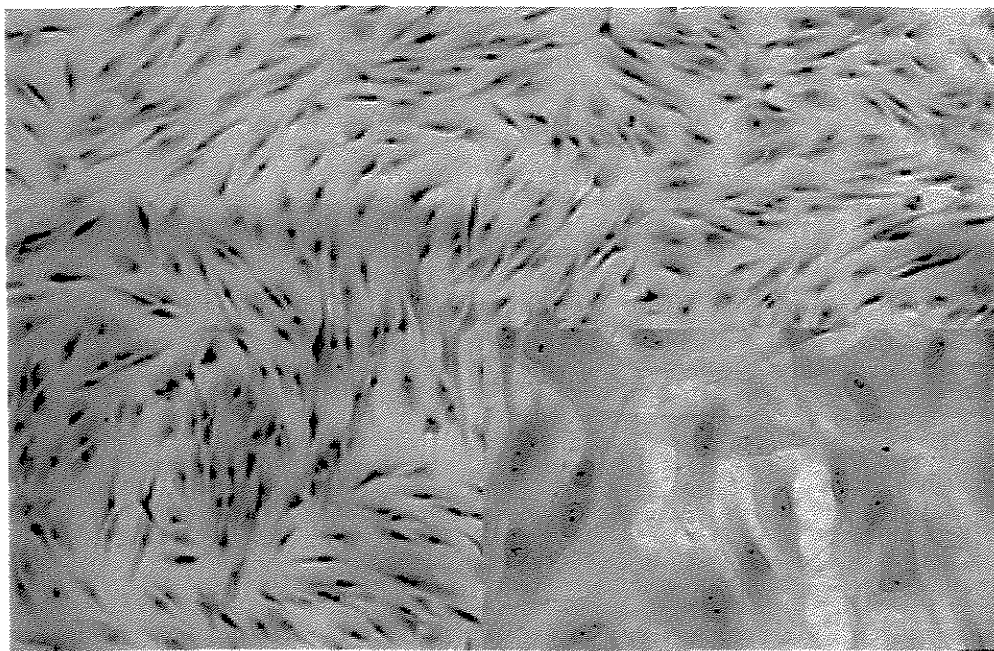
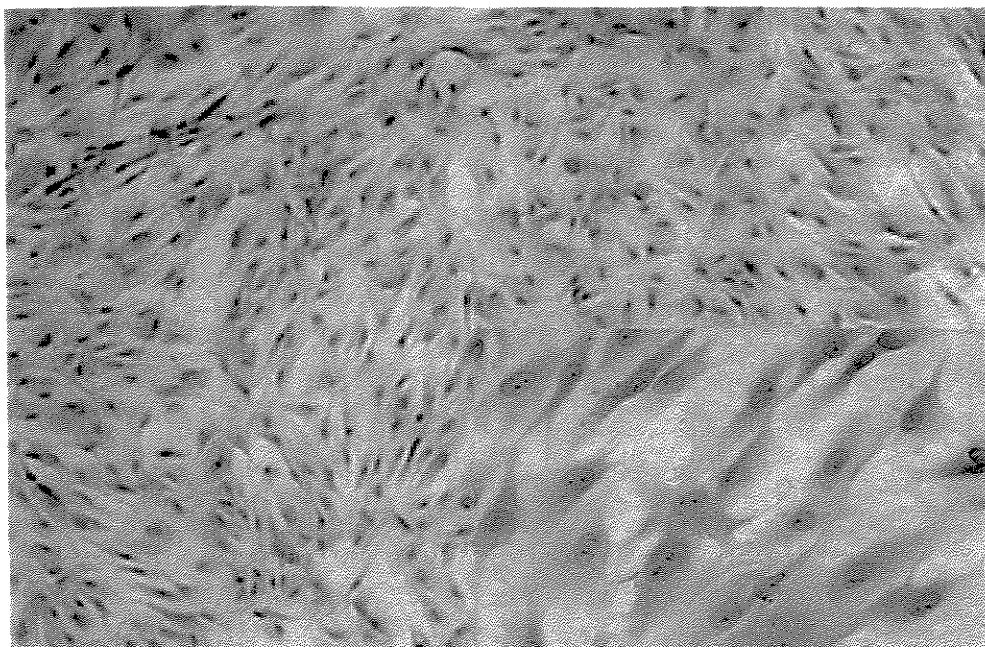


Fig.3. Fotomicrografia da gengiva de FGH após procedimento cirúrgico. A hiperplasia gengival é proveniente de um acentuado aumento no número de fibras colágenas do tecido conjuntivo. O epitélio é caracterizado por hiperplasia e profundas e delgadas criptas epiteliais que se projetam para o conjuntivo subjacente. (x250)



GN



FGH

Fig.4. Características morfológicas dos fibroblastos de GN e de FGH em confluência celular, verificados em coloração de HE, em microscopia de luz. Observar que os fibroblastos de GN apresentam dimensões maiores que os fibroblastos de FGH. (x160)

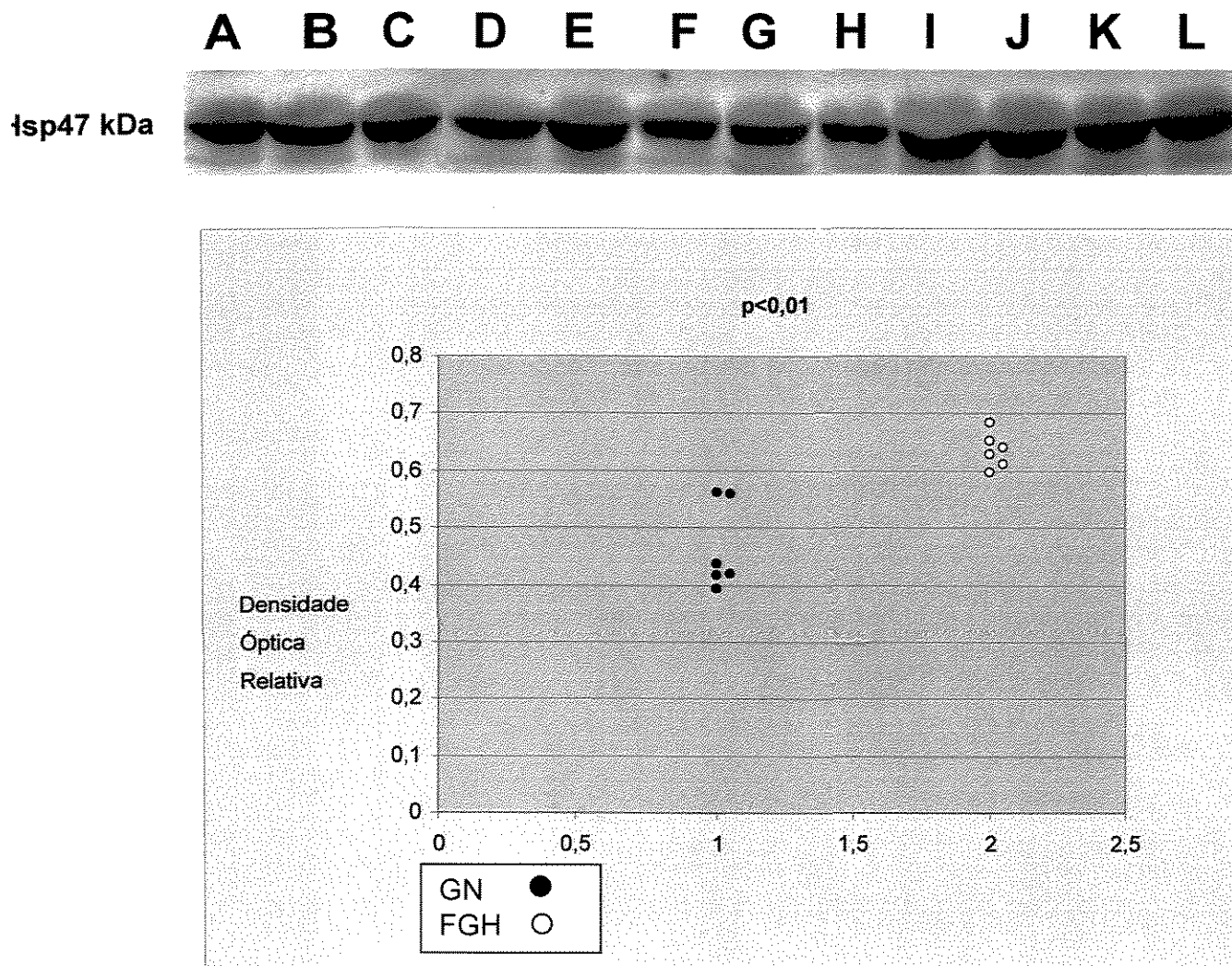


Fig. 5. No painel superior observa-se Western blot de extratos totais, utilizando anticorpos anti-Hsp47, de fibroblastos de GN (**canaletas A-F**) e de FGH (**canaleta G-L**). As canaletas A-F representam, respectivamente, GN1,3,5,6 e 7, enquanto G-L, representam, respectivamente, FGH 1,6,10,2,3 e 4. O painel inferior mostra maior produção de Hsp47 em fibroblastos de FGH, comparado a fibroblastos de GN, obtidos em densitometria e avaliados através do teste t-Student com critério bi-caudal, com $p < 0,01$.

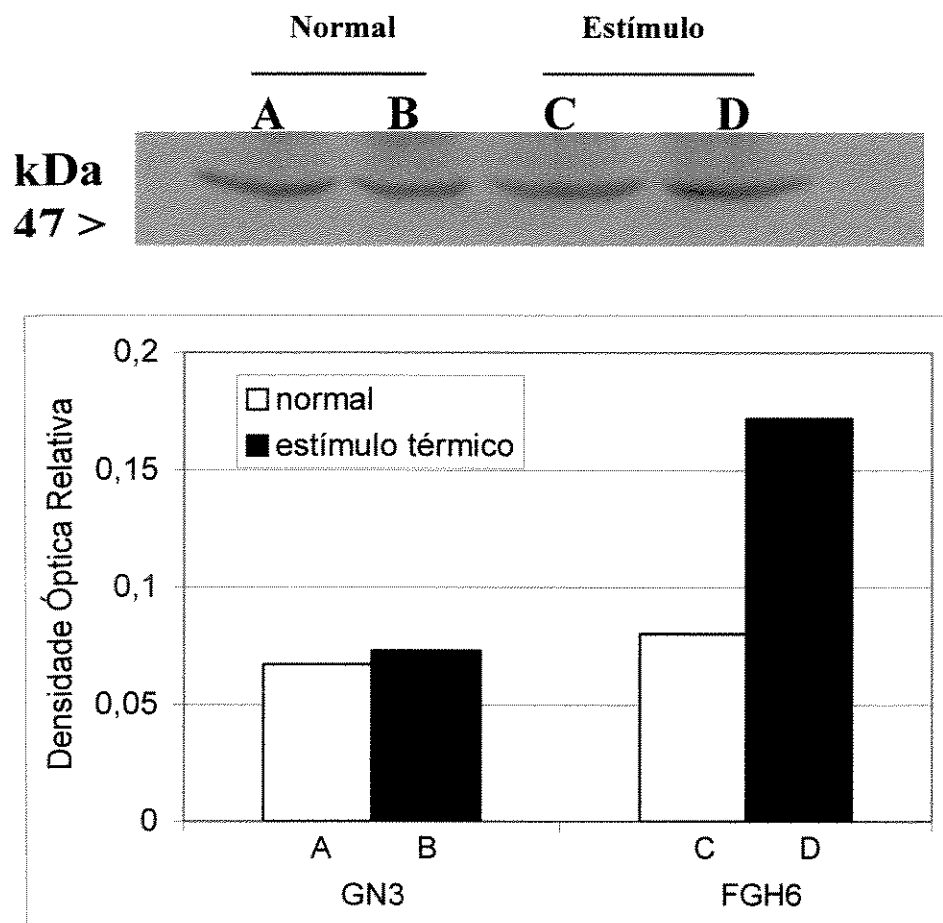


Fig. 6 . Painel superior mostra a produção protéica de Hsp47, por Western blot em fibroblastos de GN3 e FGH6, em condições de homeostasia (**canaleta A e B**) e em condições de estímulo térmico (**canaleta C e D**). O painel inferior representa a produção aumentada de Hsp47 em GN3 e FGH6, quando da presença do estímulo térmico ($p < 0,01$).

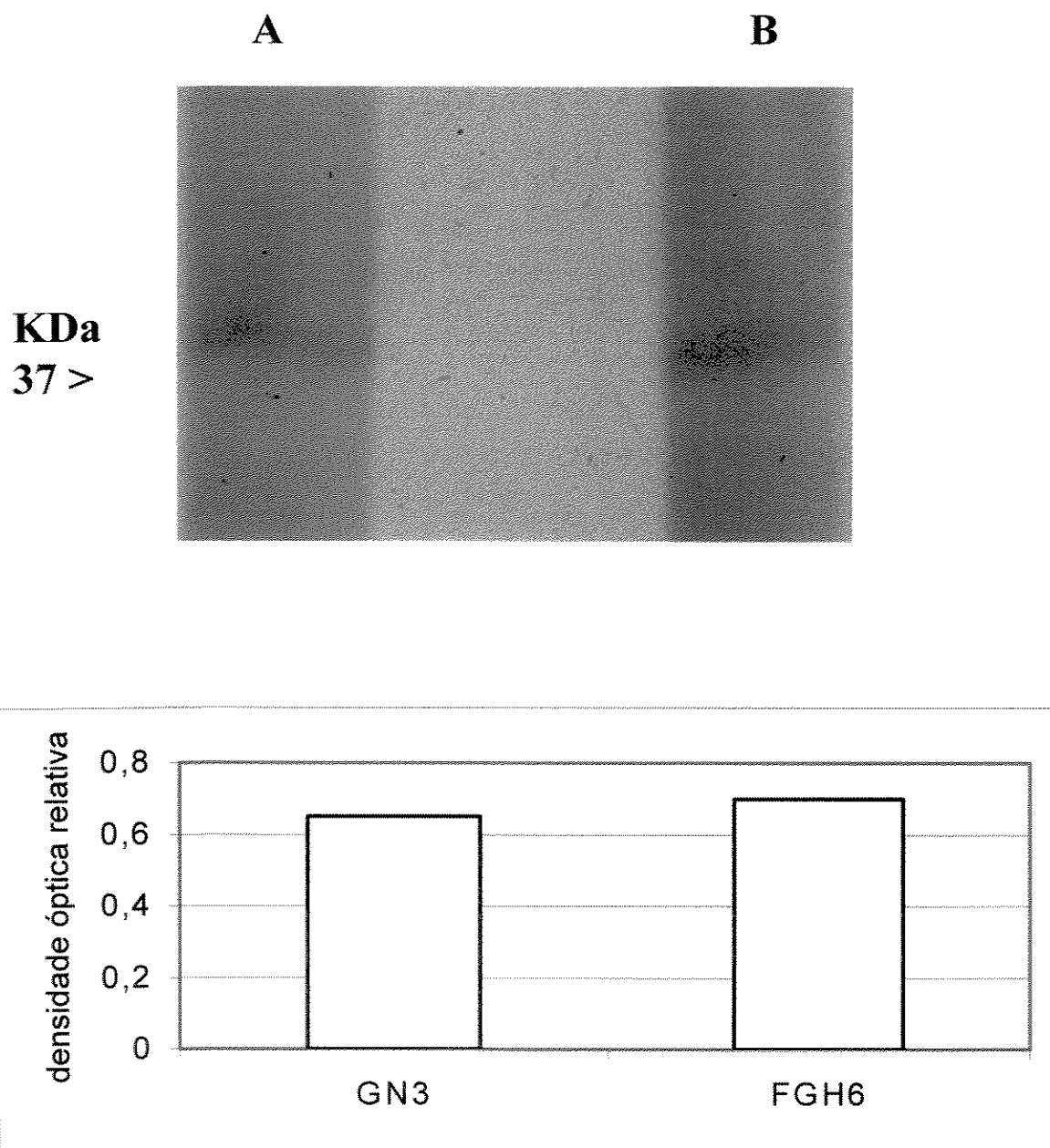


Fig. 7 . Painel superior mostra Western blot de Sec61 α de GN e FGH (canaleta A e B), respectivamente. Enquanto painel inferior mostra análise densitométrica comparando a produção de Sec61 α em fibroblastos de GN3 e fibroblastos de FGH6. Observe que as produções de Sec61 α não apresentam diferenças estatísticas nas duas linhagens celulares.

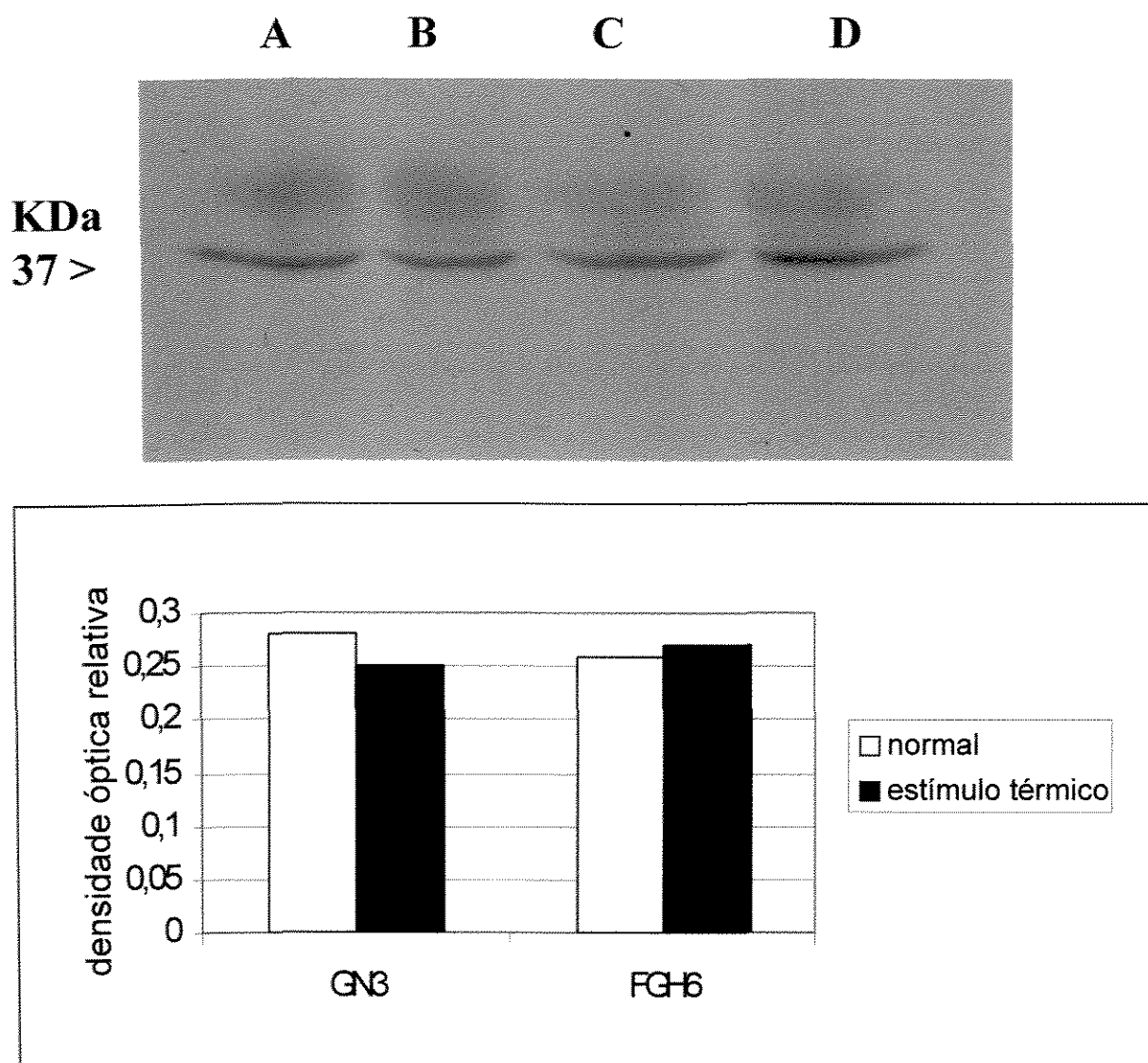


Fig. 8. Painel superior mostra Western blot para análise da produção protéica de Sec61 α . Canaletas A e C representam GN3 em homeostasia e estímulo térmico, respectivamente, enquanto B e D, FGH6 em homeostasia e estímulo térmico, respectivamente. O painel inferior ilustra análise densitométrica comparando a produção de Sec61 α em fibroblastos de GN3 e de FGH6, em condições de homeostasia e de estímulo térmico. Observa-se que não ocorre diferenças estatísticas na produção de Sec61 α entre estas linhagens.

9 - DISCUSSÃO

Aumentos gengivais fibróticos são observados clinicamente, sendo o de natureza genética denominado FGH. Esta condição oral incomum representa um crescimento fibrótico da gengiva, com grande quantidade de colágeno e outras macromoléculas da MEC, normalmente generalizado, podendo recobrir as coroas dentais em diferentes graus, resultando em alterações estéticas e funcionais para o paciente (Cuestas-Carnero e Bornancini, 1988) . No grupo estudado, o aumento gengival generalizado foi transmitido de modo autossômico dominante (Bozzo et al., 1994), sendo que os indivíduos afetados não apresentavam qualquer outra alteração, possuíam intelecto normal e não faziam uso de qualquer medicamento relacionado com aumentos gengivais.

A FGH apresenta-se de forma isolada ou associada a outras alterações, como parte de síndromes, sendo os achados mais frequentes hipertricose, retardo mental e epilepsia. Em adição as formas sindrômicas e mendelianas, fibromatose gengival é induzida por certas classes de drogas, incluindo os anticonvulsivantes, ciclosporina e bloqueadores de canais de cálcio, condições inflamatórias e processos neoplásicos.

Estudos envolvendo a atividade proliferativa e síntese de colágeno por fibroblastos da FGH são escassos e controversos na literatura. É importante observar que no trabalho de Shirasuna et al. (1989), o tecido gengival avaliado como FGH, foi obtido de dois irmãos cujos pais e outros membros da família (por três gerações) não possuíam qualquer alteração gengival semelhante. Dúvida semelhante ocorre no estudo de Johnson et al. (1986), onde o tecido gengival estudado vinha de paciente com outras anomalias além do aumento gengival, assim como o estudo realizado por Oikarinen et al. (1990). Uma explicação para tal diversidade pode ser decorrente da teoria das

subpopulações de fibroblastos, onde os mesmos, apesar das semelhanças morfológicas, apresentam diversidades bioquímicas e funcionais (Hassel e Cooper, 1980).

In vitro, fibroblastos da FGH produziram quantidade aumentada de colágeno tipo I e outras moléculas da MEC, como fibronectina (Tipton et al., 1997), e também maior capacidade proliferativa, verificado através de vários ensaios de proliferação, incluindo ensaio de crescimento celular, MTT, AgNOR, BrdU e PCNA (Coletta et al., 1998). Proliferação de fibroblastos e produção de componentes da MEC são influenciados por várias citocinas, incluindo TGF- β (Postlethwaite et al., 1988., Seppa et al., 1982). Em fibroblastos, TGF- β é mitogênico e estimula a síntese de FN e colágeno (Varga et al., 1987), sendo que a maioria das células possuem receptores de superfície para TGF- β , portanto, expostos a ação desta citocina (Massagué, 1990). Aumentos na expressão de TGF- β têm sido associado com fibroses em modelos animais (Armendariz-Borunda et al., 1990) e humanos, bem como a redução da produção de MMPs, o que poderia alterar a renovação da matriz colagênica do tecido gengival, favorecendo o acúmulo de tecido fibroso (Coletta et al., 2000a). TGF- β parece estar envolvida com a produção de colágeno, mas outros mecanismos podem também estar envolvidos, incluindo citocinas e outras proteínas que regulam o equilíbrio da composição da MEC.

O colágeno se liga a um complexo de *chaperones* que incluem Grp94, Grp78 e Hsp47, uma proteína específica na ligação de colágeno (Nakai et al., 1990; Ferreira et al., 1996). Sauk et al. (1994) demonstraram a associação de Hsp47 com Grp78, Grp94 e cadeias nascentes de colágeno I, II, III e IV, formando heterocomplexos. Estes dados suportam a hipótese de uma ação interativa entre as *chaperones* moleculares, embora o relacionamento de cada

uma destas proteínas em relação a translação/translocação e secreção do pró-colágeno tipo I, ainda não seja totalmente conhecida.

Hsp47 é uma proteína que se liga ao colágeno e atua na sua biosíntese. A sequência modelo da molécula colagênica, possui informações estruturais suficientes e necessárias para o reconhecimento por parte de Hsp47 (Hirata et al., 1999; Lamande e Bateman, 1999; Koide et al., 1999). Hsp47 é uma glicoproteína constitutivamente expressa e também afetada por estresse ambientais, como elevação de temperatura (Nagata et al., 1986). Evidências revelaram que Hsp47 é um mediador importante na polimerização de pró-colágeno, ligando a região amino-propeptídica das cadeias pró- α 1 num estágio prematuro de translocação, provavelmente após a inserção de cadeias no RE. Entretanto, com a polimerização das cadeias de colágeno, Hsp47 se dissocia da região N-terminal e as moléculas já polimerizadas são transportadas para o aparelho de Golgi e então secretadas. Desse modo, provavelmente Hsp47 executa uma função importante em inibir o empacotamento incorreto de cadeias nascentes de colágeno, facilitando a seleção da cadeia apropriada, além de ser responsável pela orientação da organização molecular. Na presença de quantidades diminuídas ou na ausência de Hsp47, moléculas existentes como cadeias nascentes se empacotam de forma imprópria e são posteriormente degradadas .

A partir de culturas de fibroblastos humanos obtidos de gengivas normais e de gengivas afetadas pela FGH, estudamos a síntese de duas proteínas envolvidas com a translação/translocação de moléculas de colágeno tipo I.

Através de técnicas de Western blot foi demonstrado um aumento na produção de Hsp47 por fibroblastos da FGH, sendo estes resultados

consistentes com os de Coletta et al. (2000b), sugerindo, assim, a indução de Hsp47 via sistema elemento-fator de choque térmico.

Os mecanismos envolvidos na translação/translocação em células de mamíferos, ainda não são totalmente conhecidos. Contudo, vários trabalhos tem fornecido evidências que glicoproteínas da membrana do RE, TRAM e o complexo Sec61p participam destes processos de translocação (Gorlich et al., 1992a). As bases para associação entre Hsp47, pró-colágeno e o complexo Sec61p permanecem desconhecidas.

Sec61 α é a maior e mais importante componente dos canais condutores de proteínas, sendo considerada essencial para a translocação de cadeias nascentes, incluindo colágeno, através desse canal de condução para as cisternas do RE. A localização precisa de Sec61 α na membrana do RE ainda não é totalmente compreendida, podendo comportar-se como uma proteína transmembrânica, com uma porção voltada para o lúmen do RE e outra para o citosol, estando próxima de cadeias polipeptídicas que iniciam a translocação (Gorlich et al., 1992a).

Tratamento de células F9 com ácido retinóico, mostrou uma co-precipitação de Sec61 α com colágeno IV, Hsp47 e Grp94. Estes resultados indicam que Sec61 α pode associar-se precocemente com cadeias nascentes de colágeno tipo IV e com Hsp47 (Ferreira, 1995).

Através de Western blot, demonstramos, em condições de homeostasia, a presença de Sec61 α tanto em fibroblastos controle (GN), como em fibroblastos de FGH, não verificando diferenças estatísticas entre ambos nas linhagens celulares estudadas. Em condições de estímulo térmico, tanto para fibroblastos da GN como para fibroblastos de FGH não verificou-se diferenças

na produção de Sec61 α , sugerindo que a mesma não é estimulada por estresse térmico, diferentemente das hsp.

Evidentemente, que o equilíbrio da composição da MEC é um processo extremamente complexo, tanto em condições normais, como em processos fibróticos, que envolve fatores extra e intra-celulares. Porém, o conhecimento da existência de variações principalmente na produção de Hsp47 é um importante ponto para o entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos na FGH.

CONCLUSÕES

10 - CONCLUSÕES

- A. Fibroblastos de FGH apresentaram uma velocidade proliferativa maior que os fibroblastos de GN nas linhagens avaliadas.
- B. A produção de Hsp47 maior em fibroblastos de FGH quando comparado a fibroblastos de GN, tanto em condições de homeostasia, como em condições de estímulo térmico.
- C. Sec61 α foi verificada em condições de homeostasia e de estímulo térmico em fibroblastos de FGH e de GN, sem alterações estatisticamente significantes observadas entre elas.
- D. Os fibroblastos da FGH representam um excelente modelo experimental para o estudo dos eventos de interação de Hsp47 e colágeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

11 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alavandar, G. (1965) Elephantiasis gingivae: report of an affected family with associated hepatomegaly, soft-tissue and skeletal abnormalities. *J all India Dent Ass* **37**: 349-53.
2. Ang D., Liberek K., Skowrya D., Zylicz M., Georgopoulos C. (1991) Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins. *J Biol Chem* **266**: 24233-36.
3. Armendariz-Borunda J., Seyer J., Kang A., Raghow R. (1990) Regulation of TGF- β gene expression in rat liver intoxicated with carbon tetrachloride. *FASEB J* **4**: 215-21.
4. Bakeen G, Scully C. (1991) Hereditary gingival fibromatosis in a family with the Zimmermann-Laband syndrome. *J Oral Pathol Med* **20**: 457-59.
5. Ball, EL. (1941) Case of gengivoma or elephantiasis of the gingiva. *J Periodontol* **12**: 96-103.
6. Barros, SP. (1991) **Fibromatose gengival hereditária - Aspectos morfológicos e ultra-estruturais**. [Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP].
7. Becker W., Collings CK., Zimmerman ER., De La Rosa M., Singdahlsen D. (1967) Hereditary gingival fibromatosis. *Oral Surg* **24**: 313-18.

8. Beckmann RP., Mizzen LA., Welch W. (1990) Interaction of hsp70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* **248**: 850-54.
9. Bond U, Schlesinger MJ. (1985) Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* **5**: 949-56.
10. Bozzo L., Almeida OP., Scully C. (1992) Familial gingival hyperplasia: a case of pseudo-Laband syndrome. *Periodont Clin Invest* **14**: 23-24.
11. Bozzo L., Almeida OP., Scully C., Aldred MJ. (1994) Hereditary gingival fibromatosis: report of an extensive four generation pedigree. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **78**: 452-54.
12. Burgeson RE. (1988) New collagens, new concepts. *Annu Rev Cell Biol* **4**: 551-77.
13. Caplan AJ., Langley E., Wilson EM., Vidal J. (1994) Hormone-dependent transactivation by the human androgen receptor is regulated by a DnaJ protein. *J Biol Chem* **270**: 5251-57.
14. Chessler SD, Byers PH. (1993) BiP binds type I procollagen pro α chains with mutations in the carboxy-terminal propeptide synthesized by cells from patients with osteogenesis imperfecta. *J Biol Chem* **268**: 18226-33.
15. Chirico WJ., Waters MG., Blobel G. (1988) 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* **332**: 805-10.

16. Ciocca DR., Oesteneich S., Chammes GC., McGuire UL., Fuqua AS. (1993) Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *J Natl Cancer Int* **85**: 1558-70.
17. Clarke EP., Jain N., Brickenden A., Lorimer IA., Sanwal BD. (1993) Parallel regulation of procollagen I and colligin, a collagen-binding protein and a member of the serine protease inhibitor family. *J Cell Biol* **121**: 1930-99.
18. Coletta RD., Almeida OP., Graner E., Page RC., Bozzo L. (1998) Differential proliferation of fibroblasts cultured from hereditary gingival fibromatosis and normal gingiva. *J Period Res* **33**: 469-75.
19. Coletta RD. (1999) **Análise da proliferação celular e expressão de colágeno e suas proteínas *chaperones*, citocinas e metaloproteinases de matriz e seus inibidores teciduais em fibroblastos gengivais de pacientes com fibromatose gengival hereditária.** [Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP].
20. Coletta RD., Almeida OP., Ferreira LR., Reynolds MA., Sauk JJ. (2000b) Increase in expression of Hsp47 and collagen in hereditary gingival fibromatosis is modulated by stress and terminal procollagen N-propeptides. *Conn Tis Res in press*.
21. Coletta RD., Almeida OP., Reynolds MA., Sauk JJ. (2000a) Alteration in expression of MMP-1 and TIMP-2 in hereditary gingival fibromatosis is mediated by TGF- β 1 autocrine stimulation. *J Period Res in press*.

22. Crowley KS., Reinhart GD., Johnson AE. (1993) The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a non cytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation. *Cell* **73**: 1101-15.
23. Cuestas-Carnero R, Bornancini CA. (1988) Hereditary generalized gingival fibromatosis associated with hypertrichosis: report of five cases in one family. *J Oral Maxillofac Surg* **46**: 415-20.
24. Danesh-Meyer MJ, Holborow DW. (1993) Familial gingival fibromatosis: a report of two patients. *N Z Dent* **89**: 119-22.
25. Darnell J, Lodish, H. (1986) The structure of collagen molecules. In *Molecular Cell Biology*, W.H. Freeman (ed.), pp. 148-57, Scientific American Books, New York, NY.
26. Davis EC, Mecham RP. (1996) Selective degradation of accumulated secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **271**: 3787-94.
27. De Silva AM., Balch WE., Helenius A. (1990) Quality control in the endoplasmic reticulum: folding and misfolding of vesicular stomatitis virus G protein in cells and in vitro. *J Cell Biol* **111**: 857-66.
28. De Silva AM., Braakman I., Helenius A. (1993) Posttranslational folding of vesicular stomatitis virus G protein in the RE: involvement of noncovalent and complexes. *J Cell Biol* **120**: 647-55.

29. Dorner AJ., Bole DG., Kaufman RJ. (1987) The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. *J Cell Biol* **105**: 2665-74.
30. Echols H. (1990) Nucleoprotein structures initiating DNA replication, transcription and site-specific recombination. *J Biol Chem* **265**: 14697-70.
31. Edwards DR., Murphy G., Reynolds JJ. (1987) Transforming growth factor β modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* **6**: 1899-04.
32. Emerson TG. (1965) Hereditary gingival hyperplasia: a family pedigree of four generations. *Oral Surg* **19**: 1-19.
33. Ferreira LR. (1995) **Study of the interaction of endoplasmic reticulum membrane and luminal proteins during collagen types I and IV translation/translocation in the mouse 3T6 and F9 teratocarcinoma cells.** [Tese (Doutorado) - University of Maryland at Baltimore-USA].
34. Ferreira LR., Norris K., Smith T., Hebert C., Sauk JJ. (1994) Association of Hsp47, Grp78, and Grp94 with procollagen supports the successive or coupled action of molecular chaperones. *J Cell Biochem* **56**: 518-26.
35. Ferreira LR., Norris K., Smith T., Hebert C., Sauk JJ. (1996) Hsp47 and other ER-resident molecular chaperones form heterocomplexes with each other and with collagen type IV chains. *Conn Tis Res* **33**: 265-73.

36. Fletcher JP. (1966) Gingival abnormalities of genetic origin: a preliminary communication with special reference to hereditary generalized fibromatosis. *J Dent Res* **45**: 597-612.
37. Flug M, Kopf-Maier P. (1995) The basement membrane and its involvement in carcinoma cell invasion. *Acta Anat* **152**: 69-84.
38. Flynn GC., Chappell TG., Rothman JE. (1989) Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* **245**: 385-90.
39. Freeman BC, Morimoto RI. (1996) The human cytosolic molecular chaperones hsp70 and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *EMBO J* **15**: 2969-79.
40. Georgopoulos C, Welch WJ. (1993) Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol* **19**: 601-34.
41. Gething MJ, McCammon K., Sambrook J. (1986) Expression of wildtype and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of bilding in intracellular transport. *Cell* **46**: 939-50.
42. Gilmore R. (1993) Protein translocation across the endoplasmic reticulum: a tunnel with toll booths at entry and exit. *Cell* **75**: 589-92.
43. Gorlich D, Rapoport TA. (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* **75**: 615-30.

44. Gorlich D., Hartmann E., Prehn S., Rapoport TA. (1992a) A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature* **357**: 47-52.
45. Gorlich D., Prehn E., Hartmann K., Kalies U., Rapoport TA. (1992b) A mammalian homolog of Sec61p and Sec61yp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* **71**: 489-503.
46. Gorlin RJ., Cohen MMJ., Levin LS. (1990) Syndromes of the head and neck. 1^a ed., p.977.
47. Greenfield JJ, High S. (1999) The Sec61 complex is located in both the ER and ER-Golgi intermediate compartment. *J Cell Sci* **112**: 1477-86.
48. Gross (1856). apud Takagi M., Yamamoto H., Mega H., Hsieh KJ., Shioda S. (1991) Heterogeneity in gingival fibromatosis. *Cancer* **68**: 2202-12.
49. Gunhan O., Gardner DG., Bostanci H., Gunhan M. (1995) Familial gingival fibromatosis with unusual histologic findings. *J Periodontol* **66**: 1008-11.
50. Hallet KB. (1995) Gengival fibromatosis and Klippel-Trénaunay-Weber syndrome: case report. *Oral Surg* **79**: 578-82.

51. Hart TC., Pallos D., Bowden DW., Bolyard J., Pettenati MJ., Cortelli JR. (1998) Genetic linkage of hereditary gingival fibromatosis to chromosome 2p21. *Am J Hum Genet* **62**: 876-83.
52. Hartsfield JK., Bixler D., Razen R. (1985) Gingival fibromatosis with sensorineural hearing loss: an autosomal dominant trait. *Cem J Med Genet* **22**: 623-27.
53. Hass IG, Wabl M. (1983) Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* **306**: 387-89.
54. Hassell TM, Cooper GC. (1980) Phenytoin-induced gingival overgrowth in mongrel cat model. In: Hassell TM., Johnson MC., Dudley KH, eds. Phenytoin-induced teratology and gingival pathology, New York: Raven Press, 1980: 147-62.
55. Hassel T, Stanek E. (1983) Evidence that healthy human gingiva contains functionally heterogeneous fibroblast subpopulations. *Arch Oral Biol* **28**: 617.
56. Hayes AS, Dice JF. (1996) Roles of molecular chaperones in protein degradation. *J Cell Biol* **132**: 255-58.
57. Hebert C., Norris K., Colleta RD., Reynolds M., Ordonez J., Sauk JJ. (1999) Cell surface colligin/Hsp47 associates with tetraspanin protein CD9 in epidermoid carcinoma cell lines. *J Cell Biochem* **73**: 248-58.

58. Heikkila JJ (1993a) Heat shock gene expression and development. I. An overview of fungal, plant and poikilothermic animal developmental systems. *Dev Genet* **14**: 1-86.
59. Heikkila JJ (1993b) Heat shock gene expression and development. II. An overview of mammalian and avian developmental systems. *Dev Genet* **14**: 87-158.
60. Hightower LE. (1991) Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* **66**: 191-97.
61. Hine MK. (1952) Fibrous hyperplasia of gingiva. *J Am Dent Ass* **44**: 681-91.
62. Hirata H., Yamamura I., Yasuda K., Kobayashi A., Toda N., Suzuki M., Hirayoshi K., Hosokawa N., Nagata K. (1999) Separate cis-acting DNA elements control cell type- and tissue specific expression of collagen binding molecular chaperone Hsp47. *J Biol Chem* **274**: 35703-10.
63. Hughes RC., Taylor A., Sage H., Hogan BLM. (1987) Distinct pattern of glycosylation of collagen, a collagen-binding glycoprotein, and SPARC (osteonectin), a secreted calcium-binding glycoprotein: Evidence for the translocation of collagen in the ER. *Eur J Biochem* **163**: 57-65.
64. Hurtley SM, Helenius A. (1989) Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol* **5**: 277-307.

65. Jain N., Brickenden A., Ball EH., Sanwal BD. (1994) Inhibition of procollagen I degradation by colligin: a collagen-binding serpin. *Arch Bioch Bioph* **314**: 23-30.
66. Jakob U, Bruchner J. (1994) Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperone. *Trends Biochem Sci* **19**: 205-11.
67. Johnson BD., El-Guingy M., Ammons WF., Narayanan S., Page RC. (1986) A defect in fibroblasts from an unidentified syndrome with gingival hyperplasia as the predominant feature. *J Periodontol Res* **21**: 403-413.
68. Jungnickel B., Rapoport TA., Hartmann E. (1994) Protein translocation common themes from bacteria to man. *FEBS letter* **346**: 73-77.
69. Kassenbrock CK., Garcia PD., Walter P., Kelly RB. (1988) Heavy-chain binding protein recognizes aberrant polypeptides translocated in vitro. *Nature* **333**: 90-93.
70. Kim YL., Shuman M., Sette M., Przybyla A. (1983) Arsenate induces stress proteins in cultured rat myoblasts. *J Cell Biol* **96**: 393-400.
71. Klausner RD, Sitia R. (1990) Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell* **62**: 611-14.
72. Klausner RD., Schwartz JL., Bonifacino JS. (1990) The cell antigen receptor: insights into organelle biology. *Ann Rev Cell Biol* **6**: 403-31.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

73. Knight BC, High S. (1998) Membrane integration of Sec61 α : a core component of the endoplasmic reticulum translocation complex. *Biochem J* **331**: 161-67.
74. Koch G., Smith M., Macer D., Webster P., Mortara R. (1986) Endoplasmic reticulum contains a common, abundant calcium-binding glycoprotein, endoplasmin. *J Cell Sci* **86**: 233-48.
75. Koide T., Asada S., Nagata K. (1999) Substrate recognition of collagen-specific molecular chaperone Hsp47. Structural requirements and binding regulation. *J Biol Chem* **274**: 3452-56.
76. Kojima T., Miyaishi O., Saga S., Ishiguro N., Tsutsui Y., Iwata H. (1998) The retention of abnormal type I procollagen and correlated expression of Hsp47 in fibroblasts from a patient with lethal osteogenesis imperfecta. *J Pathol* **184**: 212-18.
77. Kratz CL, Morin CK. (1987) Hereditary gingival fibromatosis: a child affected with concurrent abnormalities. *J Periodontol* **11**: 187-92.
78. Krone PH., Lele Z., Sass JB. (1997) Heat shock genes and heat shock response in zebrafish embryos. *Biochem Cell Biol* **75**: 487-97.
79. Kudo H., Hirayoshi K., Kitawaga Y., Imamura S., Nagata K. (1994) Two collagen-binding proteins, osteonectin and Hsp47, are coordinately induced in transformed keratinocytes by heat and others stresses. *Exp Cell Res* **212**: 219-24.

80. Kurkinen M., Taylor A., Garrels JI., Hogan BLM. (1984) Cell surface-associated proteins which bind native type IV collagen and gelatin. *J Biol Chem* **259**: 5915-22.
81. Kuroda K., Tsukifuji R., Shinkai H. (1998) Increased expression of heat-shock protein 47 is associated with overproduction of type I procollagen in systemic sclerosis skin fibroblasts. *Invest Dermatol* **111**: 1023-28.
82. Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-85.
83. Lamande SR, Bateman JF. (1999) Procollagen folding and assembly: the role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones. *Semin Cell Dev Biol* **10**: 455-64.
84. Langer T., Echols H., Flanagan J., Hayer MK., Hartl FU. (1992) Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* **356**: 683-89.
85. Laskey RA., Honda BM., Mills AD., Finch JT. (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* **275**: 416-20.
86. Linsenmayer TF. (1981) Collagen. In Cell Biology of extracellular Matrix, E.D.Hay (ed.), pp. 5-37, Plenum Press, New York, NY.
87. Lippincott-Schwartz J., Bonifacino JS., Yuan LC., Klausner RD. (1988) Degradation from the endoplasmic reticulum: disposing of newly synthesized proteins. *Cell* **54**: 209-20.

88. Massagué J. (1990) The transforming growth factor- β family. *Ann Rev Cell Biol* **6**: 597-641.
89. Matsufaira P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted ontopolyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* **262**: 10035-38.
90. Mazzearella RA, Green M. (1987) Erp99, an abundant, conserved glycoprotein of the endoplasmatic reticulum, is homologous to the 90-kDa heat shock protein (Hsp90) and the 94-kDa glucose regulated protein (Grp94). *J Biol Chem* **262**: 8875-83.
91. Mcindoe A, Smith BO. (1958) Congenital familial fibromatosis of the gums with the teeth as a probable aetiological factor: report of an affected family. *Br J Plast Surg* **11**: 62-71.
92. Moos M., Nguyen NY., Liu TY. (1988) Reproducible high yield sequencing of proteins electrophoretically separated and transferred to an inert support. *J Biol Chem* **187**: 6005-08.
93. Morange M. (1997) Multi-author review: developmental control of heat shock and chaperone gene expression. *Cell Mol Life Sci* **53**: 78-129, 168-213.
94. Morimoto RI., Tissieres A., Georgopoulos C. (1994) The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour, NY.

95. Morino M., Tsuzuki T., Ishirakami T., Yoshimura M., Kiyosuke Y., Matsunaga K., Yoshikumi C., Saijo N. (1997) Specific expression of Hsp47 in human tumor cell lines in vitro. *In vivo* **11**: 17-21.
96. Mothes W., Jungnickel B., Brunner J., Rapoport TA. (1988) Signal sequence recognition in cotranslational translocation by protein components of the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **142**: 355-64.
97. Munro S, Pelham HRB. (1986) A Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kDa glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* **46**: 291-300.
98. Nagata K., Hyrayoshi K., Obara M., Saga S., Yamada KM. (1988) Biosynthesis of a novel transformation-sensitive heat shock protein. *J Biol Chem* **263**: 8344-49.
99. Nagata K, Yamada KM. (1986) Phosphorylation and transformation sensitivity of a major collagen-protein of chick fibroblast is a novel heat shock protein. *J Biol Chem* **265**: 992-99.
100. Nagata K., Saga S., Yamada KM. (1986) A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is novel heat shock protein. *J Cell Biol* **103**: 223-29.
101. Nagata K. (1996) Hsp47: a collagen-specific molecular chaperone. *Tibs* **21**: 23-26.

102. Nakai A., Hirayoshi K., Nagata K. (1990) A transformation of BALB/3T3 cells by Simian virus 40 causes a decreased synthesis of a collagen-binding heat shock protein (Hsp47). *J Biol Chem* 265: 992-999.
103. Nakai A., Hirayoshi K., Saga S., Nagata K. (1989) The transformation-sensitive heat shock protein (Hsp47) binds specifically to fetuin. *Biochem Biophys Res Commun* 164: 259-64.
104. Nakai A., Satoh M., Hirayoshi K., Nagata K. (1992) Involvement of the stress protein Hsp47 in procollagen processing in the endoplasmatic reticulum. *J Cell Biol* 117: 903-14.
105. Nasse (1895). apud Rushton MA. (1957) Hereditary or idiopathic hyperplasia of the gums. *Dent Pract* 7: 136-46.
106. Natsume T., Koide T., Yokota S., Hirayoshi K., Nagata K. (1994) Interations between collgen-binding stress protein Hsp47 and collagen. *J Biol Chem* 269: 31224-28.
107. Nevin NC. (1971) Hereditary gingival fibromatosis. *J Ment Defic Res* 15: 130-5.
108. Oikarinen K., Salo., T., Kaar ML., Lahtela P., Altonen M. (1990) Hereditary gingival fibromatosis associated with growth hormone deficiency. *Br J Oral Maxillofac Surg* 28: 335-39.
109. Page RC, Shroeder HE. (1982) New York Karger, pp. 46-54.

110. Pelhan HRB. (1989) Control of protein exit from the ER. *Annu Rev Cell Biol* **5**: 1-23.
111. Philips GJ, Silhavy TJ. (1990) Heat-shock proteins DnaK and GroEL facilitate export of LacZ hybrid proteins in *E. coli*. *Nature* **344**: 882-84.
112. Plemper RK., Bordallo J., Deak PM., Taxis C., Hitt R., Wolf DH. (1999) Genetic interaction of hrd3p and Der3p/Hrd1p with sec61p suggest a retro-translocation complex mediating protein transport for ER degradation. *J Cell Sci* **112**: 4123-34.
113. Postlethwaite A., Raghow R., Stricklin G., Poppleton H., Seyer J., Kang A. (1988) Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: Increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 alpha and beta. *J Cell Biol* **106**: 311-18.
114. Rapoport TA., Matlack KE., Plath K., Misselwitz B., Staack O. (1999) Posttranslational protein translocation across the membrane of endoplasmic reticulum. *Biol Chem* **380**: 1143-50.
115. Razzaque MS, Taguchi T. (1997) Collagen-binding heat shock protein (hsp) 47 expression in anti-thymocyte serum (ATS)- induced glomerulonephritis. *J Pathol* **183**: 24-29.
116. Razzaque MS, Taguchi T. (1999) The possible role of colligin/Hsp47, a collagen-binding protein, in the pathogenesis of human and experimental fibrotic diseases. *Histol Histopathol* **14**: 1199-2012.

117. Redman RS., Ward CC., Patterson RH. (1985) Focus of epithelial dysplasia arising in hereditary gingival fibromatosis. *J Periodontol* **56**: 158-62.
118. Ritossa F. (1962) Chromosome puffing in *Drosophila* after exposure to heat. *Experientia* **18**: 571-73.
119. Ruggles SD. (1925) Primary hypertrophy of the gums. *J Am Med Ass* **84**: 20-4.
120. Rushton MA. (1957) Hereditary or idiopathic hyperplasia of the gums. *Dent Pract* **7**: 136-46.
121. Rutheford SL, Zuker CS. (1994) Protein folding and the regulation of signaling pathways. *Cell* **79**: 1129-32.
122. Saga S., Nagata S., Chen WT., Yamada KM. (1987) pH-dependent function, purification, and intracellular location of a major collagen-binding glycoprotein. *J Cell Biol* **105**: 517-27.
123. Satoh M., Hirayoshi K., Yokota S., Hosokawa N., Nagata K. (1996) Intracellular interaction of collagen-specific stress protein Hsp47 with newly synthesized procollagen. *J Cell Biol* **133**: 469-83.
124. Sauk JJ., Norris k., Hebert C., Ordonez J., Reynolds M. (1998) Hsp47 binds to the KDEL receptor and cell surface expression is modulated by cytoplasmic and endosomal pH. *Conn Tis Res* **37**: 105-19.

125. Sauk JJ., Norris K., Moehring J., Foster RA., Somerman MJ. (1990) The expression of colligin/Hsp47 after stress in human periodontal fibroblast in vitro. *Arch Oral Biol* **35**: 645-51.
126. Sauk JJ., Smith T., Norris K., Ferreira L. (1994) Hsp47 and the translation-translocation machinery cooperate in the production of alpha1(I) chains of type I procollagen. *J Biol Chem* **269**: 3941-46.
127. Schlesinger MJ. (1986) Heat shock proteins: the search for functions. *J Cell Biol* **103**: 321-25.
128. Sciubba JJ, Niebloom T. (1986) Juvenile hyaline fibromatosis (Murray-Puretic-Drescher syndrome): Oral and systemic findings in siblings. *Oral Surg* **62**: 397-409.
129. Sens DA., McGuirt JP., Khan W., Howel RM., Todd JH. (1997) Expression of Hsc 70, but not hsp70, in human third molar dental pulp. *Eur J Oral Sci* **105**: 271-77.
130. Seppa H., Grotendorst G., Seppa S., Schiffman E., Martin G. (1982) Platelet derived growth factor is chemotactic for fibroblasts. *J Cell Biol* **92**: 584-88.
131. Shashi V., Pallos D., Pettenati MJ., Cortelli JR., Fryns JP, von Kap-Herr C., Hart TC. (1999) Genetic heterogeneity of gingival fibromatosis on chromosome 2p. *J Med Genet* **36**: 683-86.
132. Sheffield WP., Shore GC., Randall SK. (1990) Mitochondrial precursor protein. *J Biol Chem* **265**: 11069-76.

133. Shi Y, Thomas JO. (1992) The transport of proteins into the nucleus requires the 70-Kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol* **12**: 2186-92.
134. Shirasuna K., Okura M., Watatani K., Hayashido Y., Saka M., Matsuya T. (1989) Abnormal cellular property of fibroblasts from congenital gingival fibromatosis. *J Oral Pathol* **7**: 381-85.
135. Shroff B., Orbegoso R., Norris K., Ferreira LR., Sauk JJ. (1994b) Hsp47 is associated with heterotrimeric procollagen I production/expression during molar eruption. The biological mechanics of tooth eruption, resorption and replacement by implants, ed. by. Davodovich, 391-94.
136. Shroff B., Pileggi R., Norris K., Orbegoso R., Wilson T., Sauk JJ. (1994a) Dynamic variations in the expression of type I collagen and its molecular chaperone Hsp47 in cells of the mouse dental follicle during tooth eruption. *Arch Oral Biol* **39**: 231-43.
137. Shroff B., Smith T., Norris K., Pileggi R., Sauk JJ. (1993) Hsp47 is localized to regions of type I collagen production in developing murine femurs and molars. *Conn Tis Res* **29**: 273-86.
138. Simpson JC., Roberts LM., Romisch K., Davey J., Wolf DH., Lord JM. (1999) Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast. *FEBS letter* **459**: 80-4.

139. Singer SL., Goldblastt J., Hallam LA., Winters JC. (1993) Hereditary gingival fibromatosis with a recessive mode of inheritance. Case reports. *Austr Dental J* **38**: 427-32.
140. Smith T., Ferreira LR., Hebert C., Norris K., Sauk JJ. (1995) Hsp47 and cyclophilin B transverse the endoplasmatic reticulum with procollagen into pre-golgi intermediate vesicles. *J Biol Chem* **270**: 18323-28.
141. Stirling CJ., Rothblatt J, Hosobuchi M, Deshaies R., Schekman R. (1992) Protein translocation in mutant cells is defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **3**: 129-42.
142. Strickland S, Mahdavi V. (1978) The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell* **15**: 393-403.
143. Takagi M., Yamamoto H., Mega H., Hsieh KJ., Shioda S. (1991) Heterogeneity in gingival fibromatosis. *Cancer* **68**: 2202-12.
144. Takechi H., Hirayoshi K., Nakai A., Kudo H., Saga S., Nagata K. (1992) Molecular cloning of mouse 47 kDa heat-shock protein (Hsp47), a collagen-binding stress protein, and its expression during the differentiation of F9 teratocarcinoma cells. *Eur J Biochem* **200**: 323-29.
145. Tamura Y., Peng P., Liu K., Daou M., Srivastava PK. (1997) Immunotherapy of tumors with autologous tumor derived heat shock protein preparations. *Science* **278**: 117-20.

146. Taylor A., Hogan BLM., Watt FM. (1985) Biosynthesis of EGF receptor, transferrin receptor and colligin by cultured human keratinocytes and the effect of retinoic acid. *Exp Cell Res* **159**: 47-54.
147. Thompson MW., Mcinnes RR., Willard HF. (1993), Thompson e Thompson, genética médica, 1^oed., 339p.
148. Timpl R. (1989) Structure and biological activity of basement membrane. *Eur J Biochem* **180**: 487-502.
149. Tipton DA, Dabbous MK. (1998) Autocrine transforming growth factor b stimulation of extracellular matrix production by fibroblasts from fibrotic human gingiva. *J Periodontol* **69**: 609-619.
150. Tipton DA., Howell KJ., Dabbous MK. (1997) Increased proliferation, collagen, and fibronectin production by hereditary gingival fibromatosis fibroblasts. *J Periodontol* **68**: 524-30.
151. Tissieres A., Mitchell HK., Tracy UM. (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromomosome puffs. *J Mol Biol* **84**: 389-98.
152. Tomes (1879). apud Farrer-Brown G., Lucas RB., Winstock D. (1972) Familial gingival fibromatosis: an unusual pathology. *J Oral Pathol* **1**: 76-83.
153. Unodo H., Levey DL., Srivastava PK. (1994) Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: tumor rejection

- antigen gp96 primers CD8+ T cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3077-81.
154. Varga J., Rosenbloom J., Jimenez S. (1987) Transforming growth factor beta causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem J* **247**: 597-604.
155. Verrico AK, Moore JV. (1997) Expression of the collagen-related heat shock protein Hsp47 in fibroblasts treated with hyperthermia or photodynamic. *Brit J Cancer* **76**: 719-24.
156. Winstock D. (1964) Hereditary gingivo fibromatosis. *Br J Oral Maxillofac Surg* **2**: 59-64.
157. Wolin SL. (1994) From the elephant to *E. coli*: SRP-dependent protein targeting. *Cell* **77**: 787-90.
158. Yamamura I., Hirata H., Hosokawa N., Nagata K. (1998) Transcriptional activation of the mouse Hsp47 gene in mouse osteoblast MC3T3-E1 cells by TGF- β 1. *Biochem Bioph Res Commun* **244**: 68-74.
159. Zackin SJ, Weisberger D. (1961) Hereditary gingival fibromatosis: report of a family. *Oral Surg* **14**: 828-88.
160. Zimmermann R., Sagstetter M., Lewis MJ., Pelham HRB. (1998) Seventy-Kilodalton heat shock proteins and an additional component

from reticulocyte lysate stimulated import of M13 procoat protein into microsomes. *EMBO J* 7: 2875-80.