

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

**JULIANA PEREIRA ALMEIDA**

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO E ATIVIDADE DA ENZIMA ÁCIDO  
GRAXO SINTETASE (FAS) EM FIBROBLASTOS DE  
FIBROMATOSE GENGIVAL HEREDITÁRIA (FGH) E DE GENGIVA  
NORMAL (GN).**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Estomatopatologia na área de Patologia

**PIRACICABA**

**2004**

**JULIANA PEREIRA ALMEIDA**

*Cirurgiã-Dentista*

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO E ATIVIDADE DA ENZIMA ÁCIDO  
GRAXO SINTETASE (FAS) EM FIBROBLASTOS DE  
FIBROMATOSE GENGIVAL HEREDITÁRIA (FGH) E DE GENGIVA  
NORMAL (GN).**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Estomatopatologia na área de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edgard Graner

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anamaria Aranha Camargo

Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior

**PIRACICABA**

**2004**

### Ficha Catalográfica

AL64a Almeida, Juliana Pereira.  
Análise da produção e atividade da enzima ácido graxo sintetase (FAS) em fibroblastos de fibromatose gengival hereditária (FGH) e de gengiva normal (GN). / Juliana Pereira Almeida. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.  
x, 88p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Edgard Graner.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Ácidos graxos. 2. Proliferação celular. I. Graner, Edgard. 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.



## DEDICATÓRIA

---

À minha mãe, **Mayza**, que sempre possibilitou a realização dos meus sonhos, não medindo esforços para que eles fossem alcançados. Todo o meu amor e gratidão.

Aos meus irmãos, **Marcelo** e **Mariana**, pelo carinho sempre presente durante toda a minha caminhada.

Aos meus familiares, sempre presentes, que nos momentos difíceis tornaram a caminhada mais fácil e que sempre se alegraram com minhas conquistas.

## AGRADECIMENTOS

---

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Thales de Mattos Rocha Filho**.

Ao **Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Aos professores do Departamento de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, **Drs. Oslei Paes de Almeida, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Edgard Graner, Ricardo Della Coletta, Pablo Agustin Vargas e Oswaldo Di Hipólito Júnior**, por guiarem meu aprendizado nesta instituição.

Ao **Prof. Jacks Jorge Júnior** pela confiança depositada em mim e pelas oportunidades que me proporcionaram uma formação mais ampla.

Ao **Dr. Marcelo Brum** pela receptividade e disposição com que me transmitiu tanto conhecimento, em tão pouco tempo. Minha grande admiração pela sua pessoa e competência profissional.

Aos meus professores de graduação **Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira** e **Prof. João Adolfo Costa Hanneman** pelo incentivo dado para que eu pudesse trilhar os caminhos da Estomatologia.

Ao amigo da Pós-Graduação **Paulo Rogério Ferretti Bonan** pelo incentivo e prestatividade para que eu aprofundasse meus conhecimentos em Oncologia.

Às grandes amigas que conquistei em Piracicaba **Érica, Flávia, Débora e Kellen** que nos momentos difíceis estiveram sempre presentes, e que me proporcionaram muitos momentos felizes.

Aos amigos da pós-graduação **Danyel, Dawton, Fábio Ornellas, Francisco e Jorge** que tornaram os dias mais agradáveis durante este trabalho.

Aos colegas **Roberto, Fábio Ito, Danyel, Sabrina, Michelle, Karina, Fábio Pires, Ana Lúcia** que em algum momento da execução deste trabalho contribuíram para que este pudesse ser realizado da melhor forma.

À **Michelle Agostini** e **Sílvia Maria P. Paes de Almeida** pela colaboração e agradável convivência nas atividades de cultura celular.

À **Ana Cristina do Amaral Godoy**, técnica do laboratório de Patologia Bucal, pela dedicação na realização das imunocitoquímicas deste trabalho.

Aos demais funcionários do Departamento de Patologia Bucal **Adriano Luís Martins, João Carlos Gomes da Silva Júnior, Rosa Maria Fornasier, Cristiane Rizzo, Eli Cristina Gomes Alves e Katiane da Costa Silva** pela colaboração e disponibilidade.

Aos funcionários e colegas do Orocentro **Aparecida, Débora, Valéria, Marco Antônio, Cristiane, Dawton e Francisco** por possibilitarem um aprendizado tão agradável.

Ao **Professor Edgard Graner**, pela seriedade e forma com que conduziu este trabalho, permitindo que no tempo compartilhado eu construísse um conhecimento sólido e ampliasse meus horizontes.

**“ Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno  
que não possa ensinar “.**

(Autor desconhecido)

## SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>1</b>
<b>RESUMO</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	<b>5</b>
<b>2 – REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>8</b>
<b>3 – OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>4 – MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>28</b>
<b>5 – RESULTADOS</b>	<b>37</b>
<b>6 – DISCUSSÃO</b>	<b>60</b>
<b>7 – CONCLUSÕES</b>	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>69</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

Acetil-CoA – Acetil-coenzima A  
ACP – Proteína carregadora de acil  
BSA – Albumina sérica bovina  
DAB - 3´3-Diaminobenzidina  
DHT - 5 $\alpha$ -Dihidrotestosterona  
DMEM – Meio eagle modificado por dulbecco  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DTT - Ditioneitol  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetraacético  
EGF – Fator de crescimento epidérmico  
EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico  
FAS – Ácido graxo sintetase  
FBS – Soro fetal bovino  
FGF-1 – Fator de crescimento fibroblático-1  
FGH - Fibromatose gengival hereditária  
GN – Gengiva normal  
IL-6 – Interleucina-6  
KDa – Quilodaltos  
Malonil-CoA – Malonil-coenzima A  
MAP quinases – Proteína quinase ativada por mitógeno  
NEM – N-etil-maleimida  
PBS – Solução salina tamponada por fosfato  
PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular  
PI3K – Fosfoinositídeo-3-quinase  
RPM – Rotações por minuto  
RT-PCR – Reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa  
PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsufonil

RA – Receptor de andrógeno

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SOS-1 – “son of sevenless-1”

SRE – Elemento regulatório de esteróide

SREBP – Proteína ligante do elemento regulatório de esteróide

STI – Inibidor de tripsina derivado de soja

TGF $\beta$  - Fator de crescimento transformante  $\beta$

TRIS – Tris-hidroximetil aminometano

USP2 – Protease específica de ubiquitina 2

Fibromatose Gengival Hereditária (FGH) é uma doença genética rara, caracterizada por um crescimento lento e progressivo do tecido gengival. Sua causa não é conhecida até o momento, entretanto, evidências indicam que uma elevada síntese de proteínas da matriz extracelular, associada à redução da sua degradação e a uma maior proliferação dos fibroblastos gengivais são importantes na patogenia. A Ácido Graxo Sintetase (FAS) é a enzima anabólica responsável pela produção de ácidos graxos, sendo expressa em grandes quantidades em células com alto potencial proliferativo, como as células endometriais durante a fase proliferativa do ciclo menstrual e as células de diversas neoplasias malignas. A inibição da atividade desta enzima em células tumorais leva a um bloqueio do ciclo celular que culmina com a morte por apoptose. Com o objetivo de verificar se o aumento do crescimento celular observado nas células de FGH está associado com a expressão ou atividade de FAS, oito linhagens de fibroblastos de FGH e oito de Gengiva Normal (GN) foram utilizadas neste estudo. Algumas linhagens de FGH apresentaram um potencial proliferativo significativamente maior do que os fibroblastos de GN, o que foi demonstrado através de curvas de proliferação e dos índices de positividade para as proteínas nucleares Ki-67 e PCNA. Através de experimentos de western blot, estas mesmas linhagens exibiram grandes quantidades da enzima FAS e de receptor de andrógeno (RA). A inibição da atividade de FAS, com o bloqueador natural cerulenina, provocou uma redução da proliferação tanto dos fibroblastos de FGH como dos de GN. Além disso, o tratamento destas células com DHT resultou em um aumento na expressão do RA e de FAS em linhagens de FGH e GN. Estes resultados mostram que a enzima FAS é sintetizada por fibroblastos normais e de FGH e é essencial para a proliferação destas células. Além do mais, a produção de FAS nestas linhagens pode ser regulada por andrógenos.

## ABSTRACT

---

Hereditary Gingival Fibromatosis (HGF) is a rare genetic condition clinically manifested by a slow and progressive growth of the gingival tissue. The exact biochemical and genetic mechanisms underlying this disease are not known. However, HGF is characterized by an abnormal accumulation of collagen and other extracellular matrix molecules associated with a decrease in the activity of matrix metalloproteases. Moreover, enhanced proliferation of gingival fibroblasts has also been described as important for the HGF pathogenesis. Fatty Acid Synthase (FAS) is the major anabolic enzyme involved in the endogenous production of saturated fatty acids. It is expressed in large amounts in highly proliferative cells such as in the endometrium during its proliferative phase and cancer cells. The specific inhibition of FAS in tumor cells leads to an inhibition of the cell cycle progression and apoptosis. In order to verify if the increased proliferation of the HGF cells is associated with the expression and activity of FAS, eight primary cultures of HGF fibroblasts and seven of fibroblasts from clinically normal gingiva (NG) were analyzed in this study. Proliferation curves and immunocytochemistry for Ki-67 and PCNA demonstrated that some HGF cell lines have a significantly higher proliferation than the NG fibroblasts. By using protein lysates and western blot experiments, high amounts of FAS and androgen receptor (AR) were detected in the HGF cell lines with the highest proliferative potential. The inhibition of FAS activity with cerulenin promoted a strong reduction in the proliferation of both HGF and NG fibroblasts. In addition, the treatment of HGF and NG cells with DHT enhanced AR and FAS protein levels. Taken together, these results show that FAS is synthesized by normal and HGF fibroblasts under an androgen-dependent control and is important for the proliferation of these cells.

## 1 – INTRODUÇÃO

A Fibromatose Gingival Hereditária (FGH) é uma alteração genética rara caracterizada por um crescimento lento, indolor, não hemorrágico e fibroso do tecido gengival (Jorgenson *et al.*, 1974; Redman *et al.*, 1985; Danesh-meyer *et al.*, 1993), que pode se apresentar na forma isolada ou como uma das manifestações de uma síndrome (Singer *et al.*, 1993; Danesh-Meyer *et al.*, 1993). O tecido gengival hiperplásico apresenta coloração rósea normal, com consistência firme e pontilhado superficial característicos da gengiva inserida. Os dentes podem estar total ou parcialmente recobertos pelo tecido gengival, mas o processo de erupção parece não ser afetado (Emerson, 1965; Bozzo *et al.*, 1994; Hart *et al.*, 1998). Microscopicamente a FGH é caracterizada por um tecido conjuntivo relativamente avascular, composto por espessos feixes de fibras colágenas e poucos fibroblastos jovens, revestido por um epitélio que varia de normal a acantótico, geralmente hiperqueratinizado e com cristas epiteliais proeminentes que se estendem profundamente em direção ao conjuntivo subjacente (Jorgenson *et al.*, 1974; Johnson *et al.*, 1986; Kratz *et al.*, 1988).

Estudos de ligação genética mostraram relação do cromossomo 2p21-p22 com a FGH em uma família brasileira e em quatro famílias chinesas (Hart *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 2000). Entretanto, esta relação não foi confirmada na família que deu origem às células FGH utilizadas neste trabalho (Hart *et al.*, 2000), e um segundo locus alterado no cromossomo 5q13-q22 foi encontrado por Xiao *et al.* (2001). Embora seja clara a origem genética da FGH, o mecanismo que leva ao crescimento excessivo do tecido gengival ainda é controverso. Alterações no índice de proliferação dos fibroblastos gengivais e no delicado equilíbrio entre síntese e degradação da matriz extracelular do conjuntivo gengival têm sido relatados na FGH (Tipton *et al.*, 1997; Coletta *et al.*, 1998; Coletta *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2001; Coletta *et al.*, 2002; Martelli-Junior *et al.*, 2003).

A Ácido Graxo Sintetase (FAS) é a principal enzima anabólica envolvida na produção dos ácidos graxos palmitato, estearato e miristato a partir dos

substratos acetil-CoA e malonil-CoA, na dependência de NADPH (Chirala *et al.*, 2003). É altamente expressa nos tecidos lipogênicos como o fígado, o tecido adiposo, a mama durante a lactação (Kuhajda *et al.*, 2000), nos pulmões em desenvolvimento (Lu *et al.*, 2001) e no endométrio durante a fase proliferativa do ciclo menstrual (Pizer *et al.*, 1998a). Nos demais tecidos há uma baixa expressão de FAS, pois a maior parte dos ácidos graxos provém da dieta (Kuhajda, 2000). No entanto, diversos trabalhos têm descrito que há uma alta expressão de FAS em diversas neoplasias malignas, como o câncer de mama (Kuhajda *et al.*, 1994; Pizer *et al.*, 1996b; Milgraum *et al.*, 1997), próstata (Swinnen *et al.*, 1997a; Myers *et al.*, 2001), cólon (Li *et al.*, 2000), endométrio (Pizer *et al.*, 1998a), ovário (Alò *et al.*, 2000), tireóide (Sekiguchi *et al.*, 2001), pulmão (Piyathilake *et al.*, 2000; Gabrielson *et al.*, 2001), boca (Krontiras *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004), esôfago (Nemoto *et al.*, 2001), melanoma (Innocenzi *et al.*, 2003), sarcomas de tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003), retinoblastoma (Camassei *et al.*, 2003a), neuroblastoma (Slade *et al.*, 2003), nefroblastoma (Camassei *et al.*, 2003b) e leucemia (Pizer *et al.*, 1996a). Trabalhos experimentais mostram que o bloqueio da atividade de FAS causa inibição da síntese de DNA e conseqüentemente da proliferação celular, provocando apoptose em células tumorais em cultura (Pizer *et al.*, 1996a, 1996b, 1996c; Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998a, 1998b; Kuhajda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001). Estes e outros trabalhos recentes apontam FAS como um alvo para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer. Não há, no entanto, estudos sobre a atividade e expressão de FAS em doenças proliferativas de caráter não neoplásico, como por exemplo a FGH.

O presente trabalho descreve a produção de FAS em culturas primárias de fibroblastos de FGH e de gengiva normal (GN), correlacionando-a com o potencial proliferativo destas células. A produção de receptor de andrógenos, de c-erb-B2 e de EGFR, moléculas envolvidas na regulação da expressão do gene que codifica FAS, também são avaliadas neste estudo. Por fim, são abordados os efeitos de inibidores específicos de FAS sobre a proliferação dos fibroblastos de

FGH e de GN, bem como a ação da testosterona sobre a produção de FAS nestas células.

## 2 - REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 – FIBROMATOSE GENGIVAL HEREDITÁRIA

A Fibromatose Gengival Hereditária (FGH), também referida na literatura como elefantíase gengival hereditária, hiperplasia fibrosa idiopática ou hiperplasia gengival familiar (Redman *et al.*, 1985; Kratz *et al.*, 1987) é uma alteração benigna caracterizada por um crescimento lento, indolor, não hemorrágico e fibroso do tecido gengival (Jorgenson *et al.*, 1974; Redman *et al.*, 1985; Danesh-Meyer *et al.*, 1993). O primeiro relato de um caso de FGH foi feito em 1856 por Gross (Gross, 1856 citado por Jorgenson *et al.*, 1974), sendo que desde então outros trabalhos têm sido publicados.

Esta é uma condição genética rara, cuja incidência é de aproximadamente 1:750.000 (Fletcher, 1966), podendo se apresentar na forma isolada ou, mais raramente, como uma das manifestações de uma síndrome (Singer *et al.*, 1993; Danesh-Meyer *et al.*, 1993). Não há aparentemente uma predileção por sexo (Singer *et al.*, 1993; Hart *et al.*, 1998), sendo freqüentemente observada em associação com hipertricose e, eventualmente, epilepsia e retardo mental (Gorlin *et al.*, 1990; Singer *et al.*, 1993). A FGH tem sido descrita como uma das características das síndromes de Zimmerman-Laband (displasia de nariz, orelhas e unhas, hipoplasia das falanges terminais, hiperflexibilidade das articulações e hepatoesplenomegalia), de Murray-Puretic-Drescher (múltiplos fibromas hialinos em cabeça e pescoço, infecções recorrentes e osteólise das falanges terminais), de Byars-Jurkiewicz (fibroadenoma gigante de mama, cifose secundária e hipertricose), de Rutherford (retardo na erupção dental e opacidade da córnea), de Jones (perda progressiva da audição bilateral), de Cross (hipopigmentação dérmica, microftalmia e retardo mental) e de Ramon (hipertricose, querubismo, retardo mental e somático e epilepsia) (Redman *et al.*, 1985; Gorlin *et al.*, 1990; Goldblatt *et al.*, 1992). As análises genealógicas de famílias portadoras de FGH, na sua forma isolada, são consistentes com um

padrão de transmissão mendeliano, onde a maioria dos casos tem herança autossômica dominante (Gorlin *et al.*, 1990; Bozzo *et al.*, 1994), com penetrância variável (Gorlin *et al.*, 1990). Entretanto, a FGH pode também exibir um padrão de herança autossômica recessiva (Jorgenson *et al.*, 1974; Goldblatt *et al.*, 1992; Singer *et al.*, 1993).

### **2.1.1 - Características Clínicas**

O tecido gengival hiperplásico apresenta normalmente uma coloração rósea normal, com consistência firme e pontilhado superficial característicos da gengiva inserida (Fig. I). A gengiva pode ser afetada tanto do lado vestibular como lingual, na maxila e/ou mandíbula, sendo que o grau de aumento gengival é bastante variável mesmo entre indivíduos de uma mesma família (Fletcher, 1966; Jorgenson *et al.*, 1974; Singer *et al.*, 1993). Estas diferenças no aspecto clínico da FGH entre indivíduos pertencentes a uma mesma família sugerem um defeito genético com expressividade variável (Singer *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1995). O aumento gengival pode ainda ser generalizado, envolvendo toda a gengiva da maxila e da mandíbula, ou parcial, afetando somente algumas porções da gengiva. Este tipo de envolvimento localizado é mais comum na região palatina da tuberosidade da maxila e na porção lingual da gengiva mandibular (Jorgenson *et al.*, 1974; Danesh-Meyer *et al.*, 1993). A FGH manifesta-se tipicamente durante a infância, quando coincide com a erupção dos dentes decíduos ou permanentes (Danesh-Meyer *et al.*, 1993), estando raramente presente ao nascimento (Emerson, 1965; Kharbanda *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1995). Os dentes podem estar total ou parcialmente recobertos pelo tecido gengival, mas o processo de erupção parece não ser afetado (Emerson, 1965; Bozzo *et al.*, 1994; Hart *et al.*, 1998). Algumas vezes o crescimento gengival é tão acentuado que os dentes ficam completamente recobertos, o que impede o vedamento labial. O tecido hiperplásico pode se estender para o palato ou sobre a língua, causando dificuldades de fonação. Além do mais, a mastigação pode se tornar difícil e

dolorosa quando a oclusal dos dentes é recoberta pelo tecido gengival (Emerson, 1965; Cuestas-Carnero *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 1995).

Atualmente, o tratamento indicado para a FGH é a remoção cirúrgica, sendo a gengivectomia realizada repetidas vezes no caso de recorrências (Emerson, 1965; Brown *et al.*, 1995; Ramer *et al.*, 1996).

### **2.1.2 - Características Microscópicas**

A principal característica microscópica da FGH é a presença de um tecido conjuntivo relativamente avascular, composto por espessos feixes de fibras colágenas e poucos fibroblastos jovens (Fig. II). Nas regiões mais profundas as fibras colágenas podem estar arranjadas em espirais e um infiltrado inflamatório crônico rico em plasmócitos pode ser encontrado na área adjacente ao sulco gengival (Becker *et al.*, 1967; Jorgenson *et al.*, 1974; Johnson *et al.*, 1986). Alguns mastócitos podem estar presentes entre as fibras colágenas e ao redor dos vasos sanguíneos, nas regiões mais profundas do tecido conjuntivo (Singer *et al.*, 1993). Günhan *et al.* (1995) descreveram a ocorrência de calcificações, depósitos de material amilóide e a presença de ilhas de epitélio odontogênico em amostras provenientes de três irmãos com FGH.

O tecido gengival mostra-se revestido por um epitélio que varia de normal a acantótico, geralmente hiperqueratinizado e com cristas epiteliais que penetram profundamente em direção ao conjuntivo subjacente (Jorgenson *et al.*, 1974; Johnson *et al.*, 1986; Kratz *et al.*, 1988), podendo algumas vezes se anastomosar (Ramon *et al.*, 1967; Singer *et al.*, 1993). Segundo Araújo *et al.* (2003), há alta expressão de EGF e de EGFR nestas projeções do epitélio da gengiva de FGH, a qual se correlaciona com o potencial proliferativo destas células, verificado através da marcação nuclear para PCNA.

Através de estudos de microscopia eletrônica, Collan *et al.* (1982) observaram dois tipos de fibroblastos no tecido conjuntivo de FGH. Nas áreas compostas por densas fibras de colágeno, os fibroblastos têm pouco citoplasma

ao redor do núcleo, além de pouco retículo endoplasmático liso e pequena quantidade de mitocôndrias. Os fibroblastos das áreas com menor densidade de colágeno são mais arredondados e contêm grandes quantidades de cisternas de retículo endoplasmático liso e rugoso no citoplasma, complexo de Golgi bem desenvolvido, grande número de mitocôndrias e numerosos microfilamentos finos no citoplasma. Células com morfologia intermediária também foram observadas por estes autores. Além disso, Barros *et al.* (2001) relataram alterações estruturais na matriz extracelular sintetizada por fibroblastos de FGH, dentre as quais se destaca um maior número de fibras oxitalânicas e fibras colágenas com anormalidade estruturais e variação no diâmetro.

### **2.1.3 - Etiologia da FGH**

Loci genéticos para formas autossômicas dominantes de FGH têm sido localizados nos cromossomos 2p21-p22 (FGH1) (Hart *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 2000) e 5q13-q22 (FGH2) (Xiao *et al.*, 2001). Hart *et al.* (1998) estudaram 32 indivíduos de uma família brasileira, da qual 12 apresentavam FGH, e sugeriram que alterações no cromossomo 2p21-p22 estariam relacionadas com a etiologia desta doença. Xiao *et al.* (2000) também estudaram a região 2p21-p22 de quatro famílias chinesas com FGH e encontraram coincidência parcial com os resultados publicados por Hart *et al.* (1998). Contudo, num estudo em colaboração com a Disciplina de Patologia Bucal da FOP-UNICAMP, utilizando DNA extraído da família a partir da qual foram isolados os fibroblastos utilizados no presente trabalho, a qual apresenta um padrão de herança autossômico dominante, Hart *et al.* (2000) não confirmaram estes achados e sugeriram que loci geneticamente distintos seriam responsáveis pela FGH autossômica dominante. Em estudos posteriores, Xiao *et al.* (2001) localizaram também alterações no cromossomo 5q13-q22 em uma família que não apresentava alterações no cromossomo 2p21-p22, caracterizando um segundo tipo de FGH (FGH2). Estudos genéticos mais detalhados realizados por Hart *et al.* (2002) identificaram uma mutação no gene

“Son of sevenless-1” (SOS1) em indivíduos afetados. Este gene localiza-se no cromossomo 2p21-p22 e a mutação encontrada foi uma inserção de citosina entre os nucleotídeos 3248 e 3249 do cDNA de SOS1. Esta alteração muda a fase de leitura e cria um “stop codon” prematuro, gerando uma proteína truncada e provavelmente com atividade aumentada, pois a região C-terminal inibe a sua interação com Ras.

Embora seja clara a origem genética da FGH, o mecanismo exato que leva ao crescimento excessivo do tecido gengival ainda é desconhecido. Diversos estudos têm sido realizados para se determinar a causa desta doença, no entanto, os dados disponíveis na literatura ainda não são conclusivos. Fletcher (1966) já aventava a hipótese de que alterações nos processos de síntese e degradação de colágeno poderiam estar associados ao aumento da quantidade de matriz extracelular no tecido conjuntivo gengival. De fato, outros trabalhos como os de Wilhelm *et al.* (1984), Meickle *et al.* (1986) e Shirasuna *et al.* (1989) reforçaram esta hipótese, enfatizando o papel das enzimas da família das metaloproteinases no catabolismo dos constituintes do tecido conjuntivo. Tipton *et al.* (1997), demonstraram que há um aumento na produção de fibronectina e de colágeno por fibroblastos de FGH. A estimulação autócrina pelas citocinas TGF- $\beta$ 1 e IL-6 em fibroblastos de FGH promove a diminuição da expressão de MMP-1 e MMP-2 (Coletta *et al.*, 1999; Martelli-Junior *et al.*, 2003) e o aumento da expressão e produção de colágeno tipo I e da proteína de choque térmico Hsp47 (Martelli-Junior *et al.*, 2003). Além disso, Andrade *et al.* (2001) demonstraram que TGF- $\beta$ 1 endógeno produzido em grandes quantidades por fibroblastos de FGH é um estimulador autócrino da proliferação destas células.

Há evidências na literatura de que os fibroblastos de FGH são fenotipicamente distintos dos fibroblastos de gengiva normal. Collan *et al.* (1982) identificaram, através de microscopia eletrônica, dois tipos de fibroblastos morfológicamente distintos na gengiva de FGH. Os resultados provenientes de estudos com cultura celular são, entretanto, controversos. Por exemplo, Johnson *et al.* (1986) mostraram que fibroblastos de FGH têm um crescimento semelhante

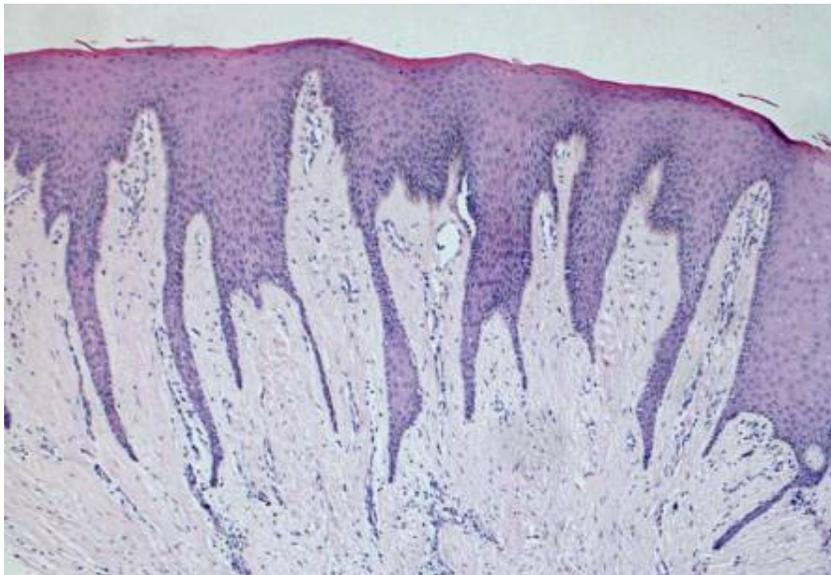
aos de GN, ao passo que Shirasuna *et al.* (1989) relataram que eles crescem menos que os de GN. Em contrapartida, Tipton *et al.* (1997) e Coletta *et al.* (1998) demonstraram um maior índice de proliferação dos fibroblastos de FGH, quando comparados com os de gengiva normal. Estas diferenças talvez possam ser explicadas pela existência de sub-populações heterogêneas de fibroblastos no tecido conjuntivo gengival, as quais foram relatadas por Hassell *et al.* (1983) e Phipps *et al.* (1997).

Coletta *et al.* (2002) verificaram que tanto fibroblastos de FGH como de GN expressam RNAs mensageiros para o receptor de andrógeno e que o tratamento destas células com o metabólito ativo da testosterona, a 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT), resultou em aumento na proliferação, o qual foi inibido por drogas anti-andrógenos. Além disso, na presença de DHT, as células de GN e FGH produziram menos IL-6, citocina que quando adicionada ao meio de cultura resultou em diminuição progressiva na proliferação.

Apesar do crescente aumento no conhecimento sobre a patogenia da FGH, mais estudos devem ser realizados no intuito de esclarecer os mecanismos biológicos que culminam com o achado clínico de aumento gengival. Estes conhecimentos serão importantes para o estabelecimento de uma terapia para a doença, assim como serão úteis para o entendimento de outros tipos de aumentos gengivais, como aqueles induzidos por drogas como a ciclosporina, a fenitoína, a nifedipina.



**Fig. I** – Aspecto clínico de um paciente de 8 anos com FGH. Note o aumento gengival generalizado, o qual apresenta coloração e textura superficial semelhantes as da gengiva normal.



**Fig. II** – Fotomicrografia do tecido gengival obtido após gengivectomia/gengivoplastia do paciente da figura I. O epitélio apresenta projeções longas em direção ao conjuntivo fibroso subjacente, o qual apresenta um aumento na quantidade de fibras colágenas (aumento original: 50X).

## 2.2 – ÁCIDO GRAXO SINTETASE (FAS)

A FAS (EC 2.3.1.85) é a enzima responsável pela produção de ácidos graxos de cadeia longa como palmitato, estearato e miristato a partir dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA, na dependência de NADPH (Chirala *et al.*, 2003). FAS é uma proteína multifuncional formada por duas cadeias polipeptídicas de 250 a 270 kDa (Myers *et al.*, 2001; Brink *et al.*, 2002), cada uma com sete sítios catalíticos distintos e um grupo prostético 4'-fosfopentateína, o qual é uma proteína carregadora de acil (ACP) (Kuhajda, 2000; Brink *et al.*, 2002; Chirala *et al.*, 2003). Estes sete domínios catalíticos estão agrupados em subdomínios, que estão dispostos a partir da extremidade N-terminal da seguinte forma: domínio I, que é formado pela sintetase  $\beta$ -cetoacil, transacilase acetil-CoA, transacilase malonil-CoA e desidratase  $\beta$ -hidroxiacil; domínio II, formado pela enoil redutase, redutase  $\beta$ -cetoacil e proteína carregadora de acil (ACP); e domínio III, contendo a tioesterase (Wakil, 1989; Smith, 1994). As duas cadeias polipeptídicas estão dispostas de forma anti-paralela e se mantêm unidas por um polipeptídeo de 640 aminoácidos, designado de interdomínio. O centro ativo da síntese do palmitato é formado pela associação do domínio I de uma cadeia com os domínios II e III da cadeia anti-paralela (Smith, 1994) (Fig III). O domínio I é o sítio de entrada dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA para a subsequente reação de condensação catalisada pela sintetase  $\beta$ -cetoacil. O domínio II é o responsável pela redução do produto formado pela elongação da cadeia e no domínio III, na região carboxi-terminal, a enzima tioesterase promove a hidrólise do ácido graxo formado (Wakil, 1989).

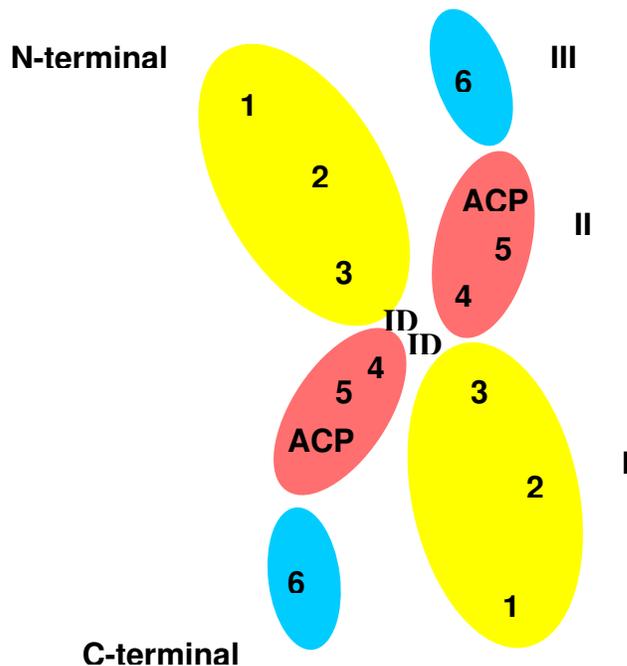


Fig. III – Representação esquemática da estrutura de FAS, baseada na descrição de Smith (1994). Domínio I: 1 – Sintetase  $\beta$ -cetoacil, 2 – Transacilase acetil-CoA/malonil-CoA, 3 – Desidratase  $\beta$ -hidroxiacil. Domínio II: 4 – Enoil redutase, 5 – Redutase  $\beta$ -cetoacil, ACP – Proteína Carregadora de Acil. Domínio III: 6 – Tioesterase. ID – Interdomínio.

FAS é altamente expressa em tecidos lipogênicos como o fígado, o tecido adiposo, a mama durante a lactação (Kuhajda *et al.*, 2000) e nos pulmões em desenvolvimento (Lu *et al.*, 2001), além do endométrio durante a fase proliferativa do ciclo menstrual (Pizer *et al.*, 1998a). Nos outros tecidos há uma baixa síntese de ácidos graxos endógenos, pois a grande maioria dos ácidos graxos utilizados pelas células provém da dieta. A síntese endógena de ácidos graxos tem três funções primárias: 1) estocar o excesso de energia ingerida sob a forma de gordura, 2) sintetizar gordura a partir de carboidratos e proteínas, se a dieta for pobre em gorduras, e 3) sintetizar os lipídios necessários para a lactação (Kuhajda, 2000).

### 2.2.1 - Regulação da expressão de FAS

A expressão de FAS em pulmões de fetos, nos quais sua atividade está relacionada com a produção da substância surfactante, é estimulada por glicocorticóides e inibida por hormônio tireoideano ( $T_3$ ) e por TGF- $\beta$ 1 (Lu *et al.*, 2001). Em contrapartida, Teruel *et al.* (1995) demonstraram que TGF- $\beta$ 1 é capaz de aumentar a expressão dos genes envolvidos na diferenciação de adipócitos, dentre os quais o que codifica a FAS, e Hsu *et al.* (1993) verificaram que a expressão dos RNAs mensageiros de FAS é rápida e transitoriamente aumentada após tratamento de fibroblastos NIH-3T3 com FGF-1. No endométrio durante a fase de proliferação e nas glândulas mamárias durante a lactação, a expressão de FAS parece ser modulada positivamente tanto por estrógeno quanto por progesterona (Pizer *et al.*, 1997; Kuhajda, 2000).

Swinnen *et al.* (1997a) mostraram que andrógenos estimulam a expressão e atividade de FAS em células derivadas de câncer de próstata (LNCaP). O tratamento destas células com testosterona resulta em grande acúmulo de lipídios no citoplasma e a adição de um anti-andrógeno (Casodex® - bicalutamida) no meio de cultura leva a uma inibição da atividade de FAS (Swinnen *et al.*, 1997a). Em um trabalho subsequente, os mesmos autores (Swinnen *et al.*, 2000) descreveram que o fator de crescimento EGF é capaz de estimular a transcrição de RNAs mensageiros de FAS em células LNCaP, através do aumento da transcrição do gene que codifica a proteína ligadora do elemento regulatório de esteróide ("Steroid Regulatory Element Binding Protein" - SREBP). As SREBPs são fatores de transcrição precursores ligados à membrana, que, quando ativados, sofrem clivagem proteolítica e liberam seu domínio N-terminal, o qual entra no núcleo e se liga aos elementos regulatórios de esteróides ("Steroid Regulatory Element" - SREs) de múltiplos genes lipogênicos (Brown e Goldstein, 1997; Xiong *et al.*, 2003). É importante salientar que o gene *FASN*, que codifica a proteína FAS, apresenta no seu promotor dois SREs independentes, os quais permitem o controle de sua expressão pelas proteínas SREBPs (Hsu *et al.*, 1996).

As SREBPs parecem participar da regulação da transcrição de FAS também em outras neoplasias malignas, como as coloretais (Li *et al.*, 2000) e de mama (Yang *et al.*, 2003).

O receptor c-erb-B2, da família erbB, quando expresso em grandes quantidades em células epiteliais de mama (HI6N2) estimula a transcrição do gene que codifica FAS (Kumar-Sinha *et al.*, 2003). Segundo este trabalho, este aumento é mediado pelas vias PI3K e MAP-quinase, as quais são capazes de elevar os níveis de SREBPs. De fato, já havia sido comprovado por Yang *et al.* (2002) que as SREBPs são capazes de estimular a transcrição de FAS em células mamárias e um mecanismo semelhante, mediado por EGF, ocorre nas células LNCaP (Swinnen *et al.*, 2000). Estudos recentes realizados com linhagens celulares estabelecidas a partir de carcinomas espinocelulares bucais mostraram que estas produzem FAS, EGFR e c-erb-B2 em grandes quantidades e muito pouco RA, sugerindo a participação dos receptores de superfície da família erbB na regulação da expressão de FAS em carcinomas bucais (Agostini *et al.*, 2004).

### **2.2.2 - Expressão de FAS em neoplasias malignas humanas**

Uma alta expressão de FAS é característica de várias neoplasias malignas. Depois da observação de que a expressão de FAS está elevada em amostras de câncer de mama (Kuhajda *et al.*, 1994), uma alta expressão desta proteína tem sido relatada em câncer de próstata, cólon, endométrio, ovário, tireóide, pulmão, boca, esôfago, melanoma, sarcomas de tecidos moles, retinoblastoma, neuroblastoma, nefroblastoma e leucemia (Pizer *et al.*, 1996a; Pizer *et al.*, 1998a; Krontiras *et al.*, 1999; Alò *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Piyathilake *et al.*, 2000; Sekiguchi *et al.*, 2001; Myers *et al.*, 2001; Nemoto *et al.*, 2001; Innocenzi *et al.*, 2003; Slade *et al.*, 2003; Takahiro *et al.*, 2003; Camassei *et al.*, 2003a; Camassei *et al.*, 2003b). Em algumas destas neoplasias, a alta produção de FAS tem sido correlacionada com um pior prognóstico, como por exemplo câncer de mama, próstata, ovário, sarcomas de tecidos moles,

retinoblastoma, nefroblastoma e melanoma (Jensen *et al.*, 1995; Alò *et al.*, 1996; Alò *et al.*, 2000; Takahiro *et al.*, 2003; Camassei *et al.*, 2003a; Camassei *et al.*, 2003b; Innocenzi *et al.*, 2003). Rossi *et al.* (2003) sugeriram que a alta expressão de FAS está associada tanto com a iniciação como com a progressão de tumores de próstata, sendo sua expressão mais alta nas metástases ósseas. Em carcinomas de pulmão, esôfago e cólon esta correlação prognóstica parece não ocorrer (Rashid *et al.*, 1997; Piyathilake *et al.*, 2000), enquanto que em carcinomas de boca uma relação entre a expressão de FAS e o grau de diferenciação histológica do tumor tem sido observada (Krontiras *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004). FAS, em carcinomas espinocelulares bucais, é produzida em maior quantidade nas lesões bem diferenciadas e possivelmente associada com um melhor prognóstico (Silva *et al.*, 2004).

Em estudo comparativo entre a expressão de FAS e o potencial proliferativo de tumores mamários através da detecção do antígeno Ki-67, observou-se um risco aumentado em nove vezes associado ao fenótipo com alta expressão de FAS e de Ki-67 (Jensen *et al.*, 1995). Resultados semelhantes foram observados em carcinomas endometriais (Pizer *et al.*, 1998a). Já nos carcinomas espinocelulares de boca a expressão de FAS não está associada à positividade para Ki-67 (Silva *et al.*, 2004).

Além da expressão de FAS em tumores malignos, alguns carcinomas *in situ* e lesões pré-malignas também apresentam uma expressão elevada desta enzima. Por exemplo, alta expressão de FAS foi detectada no epitélio displásico bucal e do esôfago (Krontiras *et al.*, 1998; Nemoto *et al.*, 2001) e em lesões pré-neoplásicas de pulmão e cólon (Rashid *et al.*, 1997; Piyathilake *et al.*, 2000). Estes achados sugerem que alterações no metabolismo de lipídios possa ser uma característica precoce do fenótipo maligno (Kuhajda, 2000).

### 2.2.3 – O papel da atividade de FAS na proliferação celular

Dentre todas as enzimas lipogênicas, a atividade de FAS está restrita à síntese de ácidos graxos e é encontrada principalmente em tecidos lipogênicos e células tumorais, o que a torna um alvo terapêutico em potencial para neoplasias malignas (Kuhajda, 2000; Kuhajda *et al.*, 2000). A construção de camundongos “knockout” para o gene que codifica FAS mostrou que esta enzima é essencial para a proliferação celular durante a embriogênese. Camundongos homozigotos nulos para FAS (*FAS* - / -) morreram antes da implantação no útero e os embriões *FAS* + / - morreram em vários estágios do desenvolvimento embrionário, mesmo na presença de uma dieta rica em ácidos graxos saturados (Chirala *et al.* 2003).

A cerulenina ([2R, 3S] -2,3 epóxi-4-oxo-7, 10-trans, transdodecadienamida) é um produto natural do fungo “*Cephalosporium cerulens*”, capaz de inibir a atividade de FAS através de sua ligação covalente ao sítio ativo da sintetase  $\beta$ -cetoacil, responsável pela condensação de acetil-CoA e malonil-CoA (Kuhajda, 2000). A cerulenina tem ação inibitória sobre o crescimento de várias linhagens celulares neoplásicas (Pizer *et al.*, 1996a, 1996c, 1998a), porém é instável. O C75 é um composto sintético mais estável e com efeitos inibitórios semelhantes aos da cerulenina (Kuhajda *et al.*, 2000). Existe ainda uma terceira substância capaz de inibir FAS, a epigallocatequina-3-galato (EGCG), um dos principais componentes polifenólicos dos chás verdes (Brusselmans *et al.*, 2003). Estes mesmos autores mostraram que esta substância é capaz de inibir FAS em células de carcinoma de próstata (LNCaP), através de ligação covalente ao sítio da redutase  $\beta$ -cetoacil (Wang *et al.*, 2003) resultando em inibição da proliferação celular e apoptose.

A inibição da proliferação celular causada pela cerulenina e pelo C75 culmina com a morte celular por apoptose (Pizer *et al.*, 1996a, 1996b, 1996c; Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998a, 1998b; Kuhajda *et al.*, 2000). Pizer *et al.* (2000) sugerem que o acúmulo de malonil-CoA possa mediar a citotoxicidade provocada pelo C75, pois o bloqueio da síntese de malonil-CoA também inibe a

produção de ácidos graxos, porém, sem causar apoptose. Zhou *et al.* (2003) verificaram que o C75 aumenta a oxidação e inibe a síntese dos fosfolipídios de membrana, o que desencadeia a apoptose juntamente com o acúmulo de malonil-CoA.

Estudos com fibroblastos NIH-3T3, células endometriais humanas, células de carcinoma endometrial e células de leucemia humana têm demonstrado uma ligação entre a proliferação celular e a biossíntese de ácidos graxos (Kuhajda *et al.*, 2000). Por exemplo, o tratamento de células HL-60, uma linhagem celular derivada de leucemia promielocítica humana, com inibidores de FAS promove um acúmulo de células em G<sub>1</sub>. Além do mais, a diferenciação destas mesmas células em macrófagos, induzida por ésteres de forbol, foi acompanhada por uma abrupta redução da proliferação celular, redução da síntese de ácidos graxos e concomitante resistência aos efeitos citotóxicos dos inibidores de FAS (Pizer *et al.*, 1996a). Uma profunda inibição da replicação do DNA, impedindo a proliferação celular, foi descrita em linhagens celulares derivadas de carcinoma de mama (MCF-7, ZR-75-1, SKBR3 e MDA435) e de câncer coloretal (HTC116 e RKO), quando incubadas com inibidores de FAS (Pizer *et al.*, 1996b; Pizer *et al.*, 1998b). O tratamento de tumores xenográficos de ovário com inibidores de FAS causou uma marcante redução da síntese de ácidos graxos pelas células tumorais e regressão das lesões, aumentando significativamente a sobrevida dos animais (Pizer *et al.*, 1996c).

O bloqueio da atividade de FAS é capaz também de diminuir o apetite, através da inibição da expressão de neuropeptídios sinalizadores hipotalâmicos, e provocar perda significativa de peso (Loftus *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2002). O tratamento de camundongos obesos com C75 resultou em diminuição de 90% da quantidade de alimento ingerido por camundongos e conseqüente perda de peso (Kumar *et al.*, 2002). Estes resultados sugerem que FAS seja também uma alternativa terapêutica para o controle da obesidade (Loftus *et al.*, 2000).

### 2.3 – ANDRÓGENOS E RECEPTOR DE ANDRÓGENO (RA)

Andrógenos (testosterona e seu principal metabólito 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona) são hormônios esteróides importantes na expressão do fenótipo masculino (George e Wilson, 1994; Brinkmann, 2001). Estes hormônios também modulam a função fisiológica de outros órgãos, como o hipotálamo, as glândulas adrenais, tireóide, hipófise, rins, fígado, glândulas salivares submandibulares, glândulas lacrimais e coração (Dorfman e Shipley, 1956), além de serem importantes para o metabolismo ósseo, muscular e do sistema nervoso central (Kleinrok *et al.*, 1994; Estrada *et al.*, 2003; Kawano *et al.*, 2003). Em mulheres, os andrógenos influenciam a função fisiológica dos ovários, útero, vagina, ovidutos, clitóris e glândulas mamárias, além de serem precursores da síntese de estrógenos (Traish *et al.*, 2002). Nos homens, andrógenos são produzidos pelos testículos, sendo as glândulas supra-renais responsáveis pela produção de grande parte dos seus precursores androgênicos, os quais são transformados em testosterona nos tecidos periféricos. Nas mulheres, as glândulas supra-renais suprem em torno de 50 a 60% da demanda (Berne e Levy, 1998).

O RA é membro da família dos receptores de hormônios esteróides e responsável por mediar os efeitos da testosterona, através da ligação do complexo testosterona/RA a seqüências específicas de DNA dos promotores dos genes que respondem a andrógenos (Gelman, 2002). O gene que codifica o RA está localizado no cromossomo Xq11-12 (Brinkmann, 2001), sendo a proteína traduzida a partir do seu RNA mensageiro composta por 918 aminoácidos, com massa molecular aparente de 110 kDa (Brinkmann, 2001; Traish *et al.*, 2002). O RA possui um sítio de ligação ao DNA, dois domínios “zinc fingers” e um sítio de ligação à testosterona (Hirawat *et al.*, 2003). A DHT se liga mais avidamente ao RA do que a testosterona, além de se dissociar mais lentamente, induzindo uma resposta biológica mais potente (Traish *et al.*, 2002).

Estudos laboratoriais têm mostrado que andrógenos, estrógenos e progesterona são ativamente metabolizados pelo tecido gengival humano, atividade que está aumentada na presença de reação inflamatória (Tilakaratne *et al.*, 1999). De fato, a conversão da testosterona em DHT é maior em células derivadas de tecido gengival inflamado (Vittekk *et al.*, 1979; Soory *et al.*, 1990) e de aumentos gengivais induzidos por drogas (Soory *et al.*, 1990). Forabosco *et al.* (1992) e Ojanotko-Harri *et al.* (1992) demonstraram, através de reações de imunohistoquímica, a presença de RA em fibroblastos dos tecidos gengival e periodontal, enquanto que Parkar *et al.* (1996) e Coletta *et al.* (2002) amplificaram seus RNAs mensageiros a partir de fibroblastos gengivais em cultura.

## **2.4 – RECEPTORES DA FAMÍLIA ERB-B**

A família dos receptores erb-B é formada por quatro receptores transmembrânicos do tipo tirosina-quinase que atuam regulando o crescimento e a diferenciação celular: receptor do fator de crescimento epidérmico (c-erb-B1 ou EGFR), c-erb-B2 ou HER-2/neu, c-erb-B3 ou HER-3 e o c-erb-B4 ou HER-4. A ativação destes receptores pelos seus respectivos ligantes resulta em dimerização e fosforilação de resíduos específicos de tirosina do domínio citoplasmático, os quais levam ao recrutamento de diversas proteínas que estimulam múltiplas vias de sinalização intracelular (O-Charoenrat *et al.*, 2002; Kumar-Sinha *et al.*, 2003). Os ligantes da família erb-B são produtos de genes distintos e consistem em mais de 30 membros, incluindo o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), anfiregulina (AR), fator de crescimento semelhante a EGF – ligante de heparina (HB-EGF), betacelulina (BTC), epiregulina (ER), além de diversas variantes de heregulinas (HRGs), também conhecidas como neuregulinas (NRGs) (O-Charoenrat *et al.*, 2002). O único receptor que aparentemente não possui ligante específico é o c-erb-B2, o qual age de forma sinérgica com os demais receptores através de heterodimerização (O-Charoenrat *et al.*, 2002).

EGFR e c-erb-B2, cujas massas moleculares são de 170 kDa e 185 kDa, respectivamente, são expressos em altos níveis em diversas neoplasias malignas, favorecendo o crescimento e a progressão destes tumores (O-Charoenrat *et al.*, 2002). Como citado anteriormente neste capítulo, a expressão forçada de grandes quantidades de c-erb-B2 em células epiteliais de mama estimula a transcrição do gene que codifica FAS através das vias PI3K e MAP-quinase, as quais são capazes de elevar os níveis de SREBPs (Kumar-Sinha *et al.*, 2003). O receptor c-erb-B2 também tem sido implicado na ativação da proliferação de carcinomas de próstata com crescimento independente de testosterona, através da ativação da mesma via usada por RA (Lin *et al.*, em fase de elaboração).

O receptor c-erb-B2 parece ser importante também para ativar a proliferação, a síntese de DNA e a síntese de colágeno em crescimentos gengivais induzidos por drogas, como a nifedipina e a fenitoína (Modeer e Anderson, 1990; Huang *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 2001). Segundo Matsumoto *et al.* (2001) e Modeer *et al.* (1990) o tratamento de fibroblastos gengivais em cultura com as drogas nifedipina ou fenitoína resulta num aumento da expressão de c-erb-B2, sugerindo que este possa contribuir para a patogenia do efeito colateral destas drogas.

## **2.5 – PROTEÍNAS Ki-67 E PCNA**

A proteína Ki-67 foi originalmente identificada por Gerdes *et al.* (1983), através da imunização de camundongos com células de Linfoma de Hodgkin, e seu cDNA clonado dez anos depois por Schluter *et al.* (1993). Duas isoformas de RNAs mensageiros foram descritas com tamanho de 8688 e 9768 pares de base, codificando proteínas com massas moleculares de 320 kDa e 359 kDa, respectivamente (Scholzen *et al.*, 2000). Embora algumas das características sugeridas pela análise de sua seqüência de aminoácidos tenham sido verificadas

experimentalmente, como por exemplo, fosforilação e transporte nuclear, a função biológica da proteína Ki-67 ainda permanece incerta (Scholzen *et al.*, 2000).

A produção de anticorpos contra a proteína Ki-67 mostrou reação positiva com núcleos de células em proliferação (Gerdes *et al.*, 1984; Kill, 1996; Starborg *et al.*, 1996). Gerdes *et al.* (1984) demonstraram que Ki-67 está presente no núcleo de células a partir do final da fase G<sub>1</sub> e durante todas as fases S e G<sub>2</sub> do ciclo celular, bem como durante a mitose. Devido ao fato do antígeno Ki-67 ser expresso em todas as células proliferantes, sejam estas normais ou neoplásicas, este passou a ser amplamente utilizado como marcador biológico para determinar a fração em crescimento de uma dada população celular (Scholzen *et al.*, 2000).

O PCNA é uma proteína encontrada em todas as células eucarióticas em proliferação, que desempenha um papel na replicação e no reparo do DNA. É uma proteína com 36 kDa que forma homotrímeros que envolvem a fita de DNA, deslizando sobre ela tanto no sentido 3' - 5' como no sentido 5' - 3' (Kelman *et al.*, 1998). Enzimas com atividades bem estabelecidas, as quais são importantes para o metabolismo de ácidos nucléicos, incluindo replicação e reparo do DNA, interagem com a proteína PCNA. Neste grupo estão as DNA polimerases, os fatores de replicação C (RFC), a DNase IV, DNAligase I, as quais participam da síntese de DNA, e proteínas envolvidas no reparo do DNA, como "MutL homolog 1" (MLH1) e "MutS homolog 2" (MSH2), proteína do xeroderma pigmentoso G (XPG) e uracil DNA glicosilase (UDG). Um outro grupo de proteínas que interage com o PCNA consiste nos reguladores do ciclo celular, como os inibidores de quinase dependentes de ciclina p21 e p57, ciclina D e proteína de resposta primária a diferenciação mielóide (Kelman *et al.*, 1998; Tsurimoto, 1998). O PCNA é expresso principalmente no final da fase G<sub>1</sub> do ciclo celular e tem sua quantidade aumentada durante a fase S, a qual é reduzida quando a célula entra nas fases G<sub>2</sub> e M (Cox, 1997; Tsurimoto, 1998; Sittel *et al.*, 1999).

A expressão de Ki-67 e PCNA tem sido freqüentemente utilizada como indicadora do potencial proliferativo de diversas neoplasias, tanto benignas como malignas, e lesões pré-neoplásicas. Por exemplo, Sandra *et al.* (2001) avaliaram a

expressão de Ki-67 e de PCNA em ameloblastomas e mostraram que os tumores tipo sólido, os quais geralmente apresentam um comportamento clínico mais agressivo, têm um maior índice de positividade para Ki-67 e PCNA. Comparando-se mucosa bucal normal e mucosa bucal com lesões leucoplásicas contendo variados graus de displasia epitelial, observou-se uma maior intensidade de marcação para Ki-67 na última, o que pode indicar a progressão destas lesões para carcinomas (Macluskey *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000). Um alto índice de marcação para Ki-67 geralmente está associado a um menor grau de diferenciação histológica e uma maior agressividade de alguns tumores malignos. Em carcinomas endometriais uma maior expressão de Ki-67 foi associada a um fenótipo mais agressivo (Cherchi *et al.*, 2001; Semczuk *et al.*, 2001). Além disso, a expressão destes marcadores também tem sido implicada como fator prognóstico em neoplasias da cavidade oral, orofaringe, tireóide, tumores hipofisários, carcinoma de próstata, bexiga, neuroblastomas e adenocarcinomas renais (Xie *et al.*, 1999; Sittel *et al.*, 1999; Bozlu *et al.*, 2002; Tejido *et al.*, 2002; Tissel *et al.*, 2003; Bantis *et al.*, 2004; Mejia *et al.*, 2004; ). Segundo Sittel *et al.* (1999), uma maior positividade para o antígeno Ki-67 reflete um prognóstico desfavorável em carcinomas de boca e de orofaringe.

### **3 – OBJETIVOS**

1 - Analisar a produção de FAS, RA, c-erb-B2 e EGFR em fibroblastos de FGH e GN.

2 - Verificar se há alguma correlação entre a quantidade da proteína FAS e os índices de proliferação de fibroblastos de FGH e GN.

3 – Estudar o efeito da inibição de FAS sobre a proliferação de fibroblastos de FGH e GN.

4 – Estudar o efeito da dihidrotestosterona (DHT) sobre a produção de FAS em fibroblastos de FGH e GN.

## 4 – MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 – CULTURA DE CÉLULAS

As linhagens de fibroblastos utilizadas neste estudo foram obtidas do banco de células da Disciplina de Patologia Bucal da FOP-UNICAMP, as quais foram estabelecidas a partir de biópsias gengivais de indivíduos de uma mesma família portadora de FGH ou de voluntários com tecido gengival clinicamente normal. Em seus aproximadamente dez anos de existência, estas células foram utilizadas em vários estudos dentro desta linha de pesquisa na FOP-UNICAMP (Coletta *et al.*, 1998; Coletta *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2001; Coletta *et al.*, 2002; Martelli-Junior *et al.* 2003).

Dentre as linhagens selecionadas para a realização deste estudo estão as FGH 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10, além dos fibroblastos de gengiva normal GN 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 e 9. Todos os experimentos aqui descritos foram realizados utilizando células entre a 2<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> passagens. Além do mais, para controlar as condições experimentais, foi utilizado somente FBS adquirido de um único lote (Gibco, BRL, Canadá; lote 1095407).

As células foram cultivadas em frascos plásticos de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> (Nunc, Dinamarca) em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, BRL, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco, BRL, Canadá), 48ug/ml de Garamicina<sup>®</sup> (Sulfato de Gentamicina 120 mg - Schering-Plough, Brasil) e 100ug/ml de Sulfato de Kanamicina (Gibco BRL, EUA), em estufa a 37°C com ambiente úmido e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado em intervalos de 48 horas e todos os cuidados para a manutenção da esterilidade das culturas foram observados. Para os subcultivos, as células foram removidas dos frascos através de tripsinização, sendo para isto previamente lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 a 37°C e incubadas com solução de tripsina a 2% contendo 0,02% de EDTA por 3 minutos, também a 37°C. A seguir, a tripsina foi inativada com DMEM contendo 10% de FBS, as suspensões celulares

centrifugadas a 3000 rpm por 3 minutos em centrífuga clínica e os “pellets” de células ressuspendidos em novo DMEM com 10% de FBS. Antes do início dos experimentos, todas as linhagens celulares foram recongeladas visando manter o estoque de células e para que células em passagens semelhantes pudessem ser comparadas durante todo o estudo. Para tanto, as células foram tripsinizadas, ressuspendidas em partes iguais de DMEM contendo 50% de FBS e DMEM com 20% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, EUA), acondicionadas em criotubos (Nunc, Dinamarca) e mantidas em nitrogênio líquido. Para descongelar as linhagens, os criotubos eram colocados em banho-maria a 37°C, as suspensões celulares diluídas em 10 ml de DMEM com 10% de FBS, centrifugadas e ressuspendidas em novo DMEM com 10% de FBS para plaqueamento nos frascos, placas ou lâminas para cultura celular, de acordo com o tipo de experimento realizado.

## **4.2 – ESTIMATIVA DO POTENCIAL PROLIFERATIVO DAS CÉLULAS DE FGH E GN**

### **4.2.1 – Curvas de proliferação celular**

Para comparar o crescimento celular através de curvas de proliferação, fibroblastos de FGH ou GN foram cultivados em frascos de 25cm<sup>2</sup> (Nunc, Dinamarca) até que atingissem uma confluência de cerca de 90%, observada em microscópio de contraste de fase. As células foram então tripsinizadas, sendo 100µl de cada suspensão coletados, misturados em 10ml de tampão Isoton (Coulter Balanced Electrolyte Solution, Beckman, EUA) e as células contadas em contador automático de partículas (Coulter Counter Z-1, Beckman, EUA). Foram então plaqueadas  $2 \times 10^4$  células contidas em 1ml de DMEM com 10% de FBS em cada poço de placas de 24 poços (Nunc, Dinamarca), as quais foram mantidas a 37°C por 24 horas. A seguir, as células foram incubadas em meio DMEM contendo 0,1% de FBS por um período de 48 horas, para que houvesse uma sincronização

dos ciclos celulares (Tobey *et al.*, 1988; Starborg *et al.*, 1996; Iyer *et al.*, 1999). Transcorrido este período, as células foram novamente tratadas com DMEM contendo 10% de FBS e tripsinizadas nos períodos de 24, 48, 96, 192 horas. Todas as contagens foram realizadas em triplicatas no contador automático de partículas. Os resultados foram obtidos através do cálculo da média das contagens e expressos em gráficos de linha, com o auxílio do programa EXCEL (Microsoft, EUA).

#### **4.2.2 – Reações imunocitoquímicas para detecção de PCNA e de Ki-67**

Fibroblastos de FGH foram plaqueados em lâminas para cultura de células de 8 poços (Lab Tek Nunc, EUA) ( $3 \times 10^4$  células/poço em 400 $\mu$ l de DMEM com 10% de FBS) e mantidos a 37°C por um período de 48 horas. As células foram então fixadas com etanol a 70% por 15 minutos, lavadas com PBS e incubadas com anticorpos primários monoclonais anti-PCNA (clone PC10 - Dako, Dinamarca), diluídos a 1:24.000 em PBS por 16 horas em ambiente úmido a 4°C. Após este período, realizou-se a incubação com os anticorpos secundários biotinilados (Dako) na diluição de 1:500, também em PBS e ambiente úmido a 37°C por 30 minutos. A revelação foi realizada com o complexo estreptoavidina-biotina (StreptABComplex / HRP Duet, mouse/rabbit, Dako) na diluição de 1:500 da solução A e 1:500 da solução B em PBS por 30 minutos a 37°C e 1,2mg/ml de 3´3 diaminobenzidina (DAB - Sigma) diluída em PBS contendo 1% de peróxido de hidrogênio e 1% de dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma) por 5 minutos a 37°C. Depois da contra-coloração das lâminas com Hematoxilina de Carazzi (Nuclear, Brasil) por 2 minutos, a porcentagem de células positivas foi obtida através da contagem em duplicata de 1500 células por linhagem, em microscópio de luz com objetiva de 40X e intensidade de luz padronizada.

As reações para detecção do antígeno Ki-67 foram realizadas como descrito acima, com anticorpos primários monoclonais anti-Ki-67 (clone MIB-1, Dako) na diluição de 1:50 em PBS por 16 horas em ambiente úmido a 4°C. Após

este período, realizou-se a incubação dos anticorpos secundários biotinilados (Dako) na diluição de 1:200 em PBS, sendo a revelação, a contra-coloração e a análise da positividade realizadas como descrito para PCNA.

Reações imunocitoquímicas para detecção do antígeno Ki-67 também foram realizadas em fibroblastos de FGH e de GN sincronizados com DMEM suplementado por 0,1% de FBS por um período de 48 horas ( $3 \times 10^4$  células/poço em 400 $\mu$ l de DMEM com 10% de FBS) e fixados, 14 horas após o retorno do DMEM com 10% de FBS, em etanol a 70% por 15 minutos.

#### **4.2.3 – Análise dos índices mitóticos**

Para o cálculo dos índices mitóticos,  $3 \times 10^4$  fibroblastos de FGH ou de GN (em 400 $\mu$ l de meio DMEM com 10% de FBS) foram plaqueados em cada poço de lâminas para cultura celular com 8 poços (Lab Tek, Nunc, EUA) e mantidos a 37°C por 24 horas. Após este período as células foram incubadas com DMEM suplementado com 0,1% de FBS por 48 horas para sincronização dos ciclos celulares. Em seguida, DMEM com 10% de FBS foi novamente adicionado às culturas e estas fixadas 28 horas após o final do carenciamento com etanol a 70% por 15 minutos, lavadas com PBS e coradas com Hematoxilina de Carazzi (Nuclear, Brasil) por 1 minuto. O mesmo procedimento foi realizado em culturas não sincronizadas de fibroblastos de FGH. Assim, as linhagens de FGH foram então plaqueadas em lâminas para cultura celular de 8 poços (Lab Tek, Nunc, EUA) ( $3 \times 10^4$  células/poço em 400 $\mu$ l de DMEM com 10% de FBS), fixadas com etanol a 70% por 15 minutos, lavadas com PBS e coradas com Hematoxilina de Carazzi (Nuclear, Brasil) por 1 minuto quando a linhagem com maior índice de proliferação atingiu confluência de cerca de 90%.

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e os resultados obtidos pela contagem de 1500 células por linhagem, em microscópio de luz com objetiva de 40X e intensidade de luz padronizada, sendo expressos como a porcentagem de figuras mitóticas em relação ao número total de células.

### **4.3 – ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE FAS, RA, EGFR E c-erb-B2 EM FIBROBLASTOS DE FGH E GN**

#### **4.3.1 – Preparação dos extratos protéicos e separação eletroforética de proteínas**

Os fibroblastos de FGH ou de GN foram cultivados em frascos de 75 cm<sup>2</sup> (Nunc) até que atingissem confluência de aproximadamente 70%, o meio de cultura foi então substituído por DMEM suplementado com 0,1% de FBS e mantido por 48 horas. Após este período de carenciamento, DMEM suplementado com 10% de FBS foi novamente utilizado por 14 horas, quando os extratos protéicos foram preparados. As células foram raspadas dos frascos com auxílio de um “scraper” (Disposable Cell Scraper, Costar, E.U.A.) e lavadas com PBS pH 7,4 a 4°C para que todo o meio de cultura fosse removido. Depois de centrifugadas a 3000rpm por 3 minutos, o PBS foi descartado e os “pellets” celulares lisados com 100µl de tampão de extração (10% de sacarose, 1% de Triton X-100, 20 mM de Tris pH 8,0, 137 mM de NaCl, 10% de glicerol, 2 mM de EDTA e 1 mM de NaF) contendo inibidores de proteinases, adicionados no momento do uso: PMSF (1mM), NEM (1mM), STI (10µg/ml), Benzamidina (1mM) e Pepstatina-A (1,4mM). O tampão de extração foi adicionado sobre os “pellets” celulares, os quais foram ressuspendidos com o auxílio de uma micropipeta e mantidos sobre o gelo por um período de 30 minutos, com agitação a cada 10 minutos. A seguir as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 14.000 rpm em microcentrífuga, também a 4°C, e os sobrenadantes contendo as proteínas transferidos para tubos devidamente identificados e mantidos a – 80°C até o momento do uso. Antes do congelamento, alíquotas de 5µl foram colocadas em tubos separados, para posterior quantificação protéica. Extrações protéicas de células em crescimento não sincronizado também foram realizadas usando-se culturas com cerca de 80% de confluência.

A quantificação protéica foi realizada através do método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando curvas de BSA (Bio Rad Protein Standard) como padrão. A mesma massa de proteínas totais de cada lisado celular foi utilizada para eletroforese, sendo as amostras misturadas com tampão de amostra redutor (0,25M de Tris-HCl pH 6,8, 8% de SDS, 30% de glicerol, 0,2% de azul de bromofenol, 0,2M de DTT) e fervidas por 5 minutos para assegurar uma completa desnaturação das proteínas. Todas as amostras foram separadas em géis de poliacrilamida-SDS a 6 ou 8% (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose (Nitrocelulose-1, Gibco, BRL, EUA), por no mínimo 3 horas, em tampão de transferência contendo 120 mM de Tris, 15 mM de glicina e 20% de metanol.

#### **4.3.2 – Reações de Western blot**

As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas durante 16 horas a 4°C com tampão TBST (20mM Tris-HCl pH 7,6, 137mM de NaCl e 0,1% de Tween 20) contendo 5% de leite em pó desnatado (Nestlé, Brasil). Após o bloqueio procederam-se as incubações com os anticorpos primários diluídos no mesmo tampão de bloqueio, a temperatura ambiente e sob agitação constante por um período de 2 horas. As diluições utilizadas foram as seguintes: anti-FAS (Transduction Laboratories, EUA) 1:2000, anti-RA (clone PG21, Upstate Biotechnology, EUA) 1µg/ml, anti-c-erb-B2 (Dako) 1:20.000, anti-EGFR (clone Ab-3, Dako) 1:500 e anti-β-actina (clone AC-15, Sigma) 1:30.000. Depois de 4 lavagens de 15 minutos cada com tampão TBST, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários diluídos a 1:1000 em TBST contendo 5% de leite desnatado, por 1 hora a temperatura ambiente e agitação constante (anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase para as reações cujos primários foram anti-FAS, anti-EGFR ou anti-β-actina e anti-IgG de coelho, também conjugada com peroxidase, para as reações com anti-RA ou anti-c-erb-B2). Seguiram-se mais 4 lavagens de 15 minutos cada e as reações foram reveladas através de

quimioluminescência, usando-se o kit de detecção ECL – “Western Blotting Analysis System” (Amershan Pharmacia Biotech, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As membranas de nitrocelulose foram expostas a filmes radiográficos X-Omat AR (Eastman Kodak Co., EUA), nos tempos padronizados para cada proteína estudada, e a densitometria das bandas realizada em densitômetro GS-700 (Bio Rad, EUA) com o programa Molecular Analyst (Bio Rad, EUA).

#### **4.3.3 – Análise imunocitoquímica da expressão de FAS e de c-erb-B2**

Trinta mil fibroblastos de FGH ou de GN foram plaqueados em cada poço de lâminas para cultura de células de 8 poços (Lab Tek, Nunc, EUA) em 400µl de DMEM com 10% de FBS. Vinte e quatro horas após o plaqueamento as células foram carenciadas em DMEM contendo 0,1% FBS e, 14 horas após a volta do meio com 10% de FBS, fixadas com solução de paraformaldeído (3,7% de paraformaldeído e 0,12M de sacarose diluídos em PBS) por 15 minutos. Depois de lavadas com PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpos primários monoclonais anti-FAS, na diluição de 1:3.000 em PBS por 20 horas, ou anti-c-erb-B2, na diluição de 1:50 em PBS por 16 horas, ambos em ambiente úmido e a 4°C. Após este período, realizou-se a incubação dos anticorpos secundários biotinilados (Dako) na diluição de 1:500 em PBS em ambiente úmido a 37°C, por 30 minutos. As revelações foram realizadas como descrito no item 4.2.2 deste capítulo.

#### **4.4 – EFEITO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE FAS NA PROLIFERAÇÃO DOS FIBROBLASTOS DE FGH E GN**

As linhagens de FGH (5 e 4) e GN (2 e 5), com maior e menor capacidade proliferativa, respectivamente, foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços (Nunc) e mantidas a 37°C por 24 horas ( $2 \times 10^4$  células/poço em

500µl de DMEM com 10% de FBS). Após este período, as células foram incubadas com DMEM suplementado com 0,1% de FBS por 48 horas e, a seguir, divididas em dois grupos: no primeiro as células foram tratadas com DMEM contendo 10% de FBS e 5µg/ml do inibidor natural da atividade de FAS cerulenina (Sigma) e no segundo incubadas em DMEM com 10% de FBS adicionado da quantidade equivalente de DMSO (Sigma), solvente da cerulenina. As contagens foram realizadas em triplicatas em contador automático de partículas, nos períodos de 48, 72, 96 e 120 horas, como descrito em 4.2.1 e os resultados obtidos através da média das contagens e expressos em gráficos de linha, realizados no programa EXCEL (Microsoft, EUA).

#### **4.5 – EFEITO DA DHT SOBRE PRODUÇÃO DE FAS POR FIBROBLASTOS DE FGH E GN**

Quinhentas mil células das linhagens FGH 5 e GN 2 foram plaqueadas em frascos para cultura de 150cm<sup>2</sup> e mantidas a 37°C por 24 horas. Após este período, as linhagens foram incubadas com DMEM contendo 0,1% de FBS e mantidas sob estas condições por 48 horas. Logo após, um frasco de cada linhagem foi tratada com 10nM de DHT (Sigma) em DMEM com 10% de FBS, ou com o mesmo meio de cultura acrescido de quantidade equivalente de etanol absoluto por 48 horas. O extrato protéico e a quantificação das proteínas foram realizados como descrito no item 4.3.1. As proteínas dos lisados celulares obtidos foram então separadas eletroforicamente em gel de poliacrilamida - SDS a 8% e as reações de western blot realizadas como descrito anteriormente, com anticorpos primários anti-FAS diluídos 1:2000, anti-RA na concentração de 0.8µg/ml ou anti-β-actina a 1:30.000.

#### **4.6 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

A significância estatística dos resultados foi verificada através da análise de variância não paramétrica (teste Mann-Whitney) para comparação entre os grupos, com o auxílio do programa computacional SigmaStat (Jandel Scientific Software, EUA). O nível de significância adotado foi de 0,05.

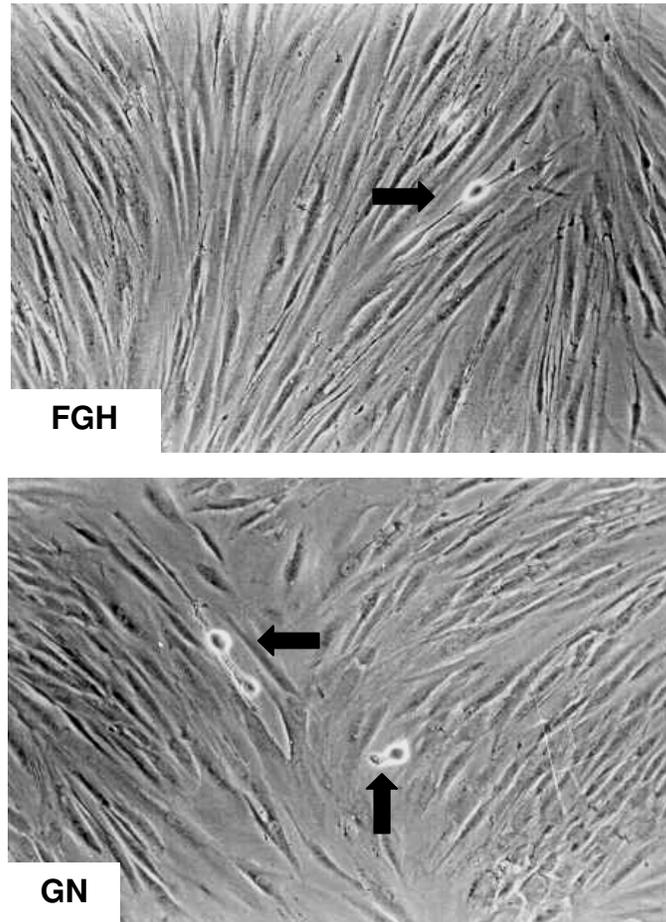
## 5 – RESULTADOS

### 5.1 – PROLIFERAÇÃO CELULAR

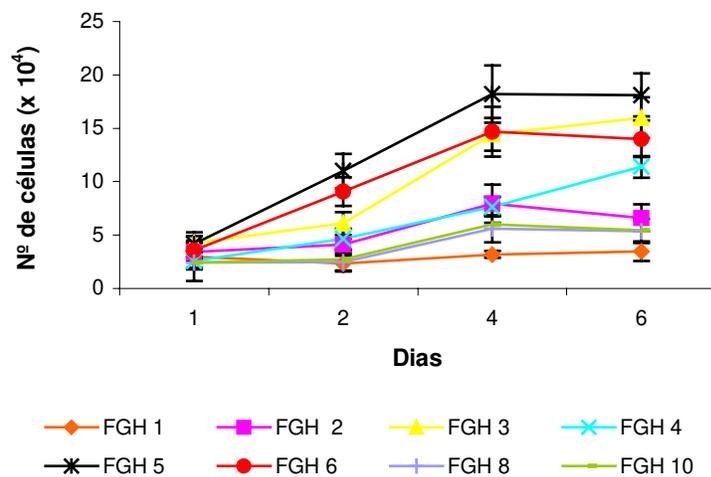
#### 5.1.1 – Curvas de proliferação

A construção de curvas de crescimento mostrou que fibroblastos de FGH em cultura (Fig. 1) são bastante heterogêneos, pois algumas das linhagens apresentam altos índices de proliferação e outras crescimento lento, algumas vezes menor que o de fibroblastos derivados de GN (Figs. 2 e 3). Por outro lado, as curvas de proliferação obtidas com os fibroblastos de GN mostram um potencial proliferativo semelhante entre todas as linhagens (Fig. 3). Estas diferenças na proliferação das linhagens de FGH talvez possam ser explicadas pela existência de sub-populações celulares distintas no tecido conjuntivo gengival, como sugerido por Hassel *et al.* (1983). Desta forma, durante o estabelecimento das culturas primárias a partir de fragmentos gengivais, fibroblastos com vantagens proliferativas poderiam passar a predominar em algumas das linhagens.

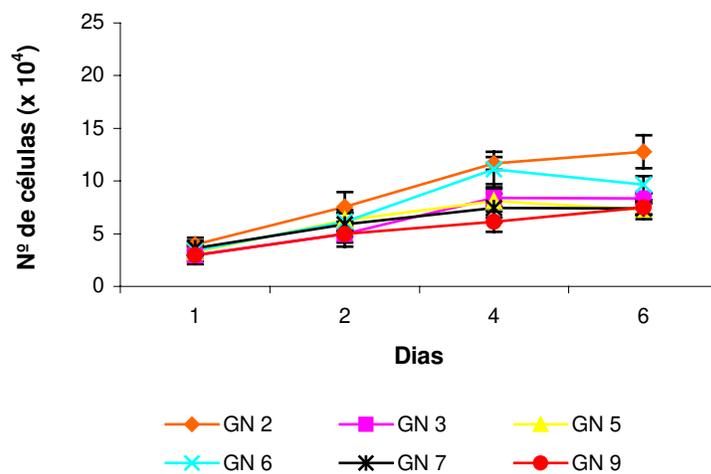
Entretanto, quando comparamos as linhagens com maior índice de proliferação de FGH (FGH 3, 5 e 6) e de GN (GN 2, 3 e 6), uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) pôde ser observada (Fig. 4). Estes resultados confirmam os achados de trabalhos anteriores que encontraram um índice de proliferação das células de FGH maior do que as de GN (Tipton *et al.*, 1997; Coletta *et al.*, 1998). Porém, devido à grande variabilidade das células FGH, quando comparamos a média das contagens de todas as linhagens FGH com a média de GN não observamos diferenças na taxa de crescimento (Fig. 5).



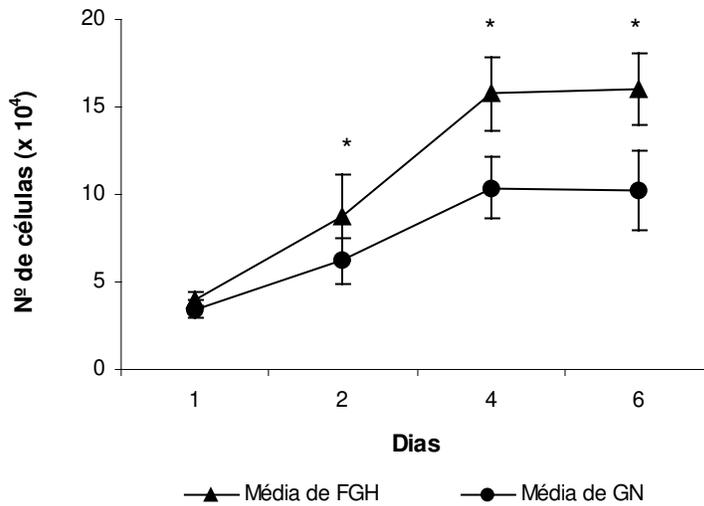
**Fig. 1** – Fibroblastos de FGH e GN em cultura sob confluência de aproximadamente 90%. Observe que as células se dispõem formando feixes e as setas apontam fibroblastos em mitose (FGH 10 e GN 9).



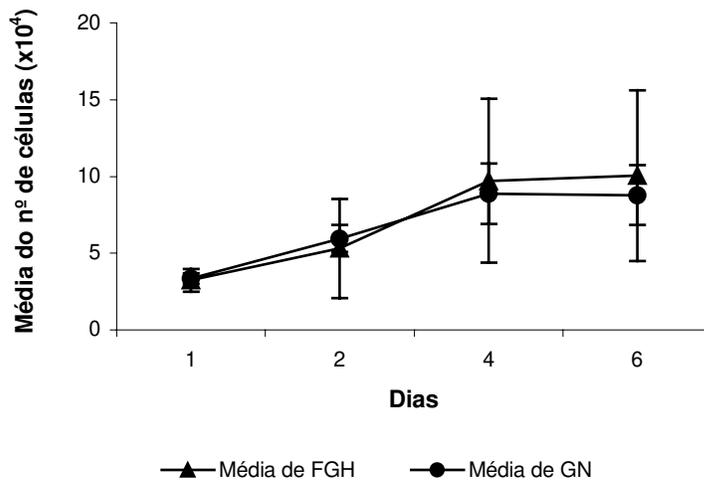
**Fig. 2** – Curvas de proliferação dos fibroblastos isolados de FGH. Note que dois grupos distintos se formaram, um com maior crescimento (FGH 3, 5 e 6) e outro com baixa proliferação (FGH 1, 2, 4, 8 e 10).



**Fig. 3** – Curvas de proliferação dos fibroblastos de GN. Todas as linhagens celulares isoladas da GN mostraram uma taxa de crescimento celular semelhante.



**Fig. 4** – Curvas de proliferação construídas com as médias das contagens das linhagens que mais proliferaram (FGH 3, 5 e 6 e GN 2, 3 e 6), mostrando uma diferença estatisticamente significativa entre elas (Mann-Whitney: \*  $p < 0,001$ ).

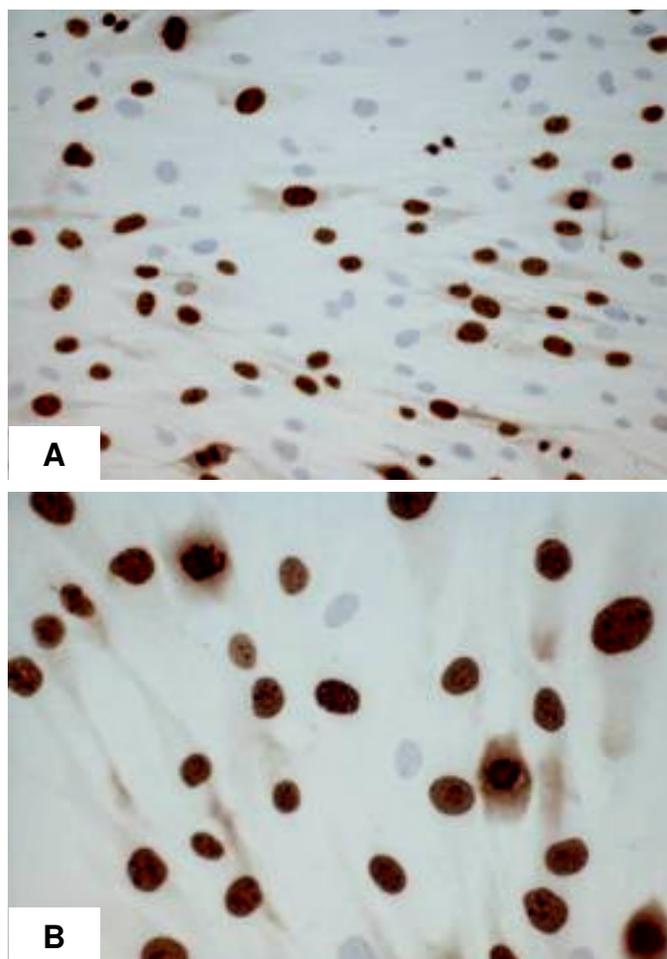


**Fig. 5** – Curvas de proliferação construídas a partir das médias das contagens de todas as linhagens de FGH e de GN, mostrando uma taxa de crescimento celular semelhante (Mann-Whitney: \*  $p > 0,001$ ).

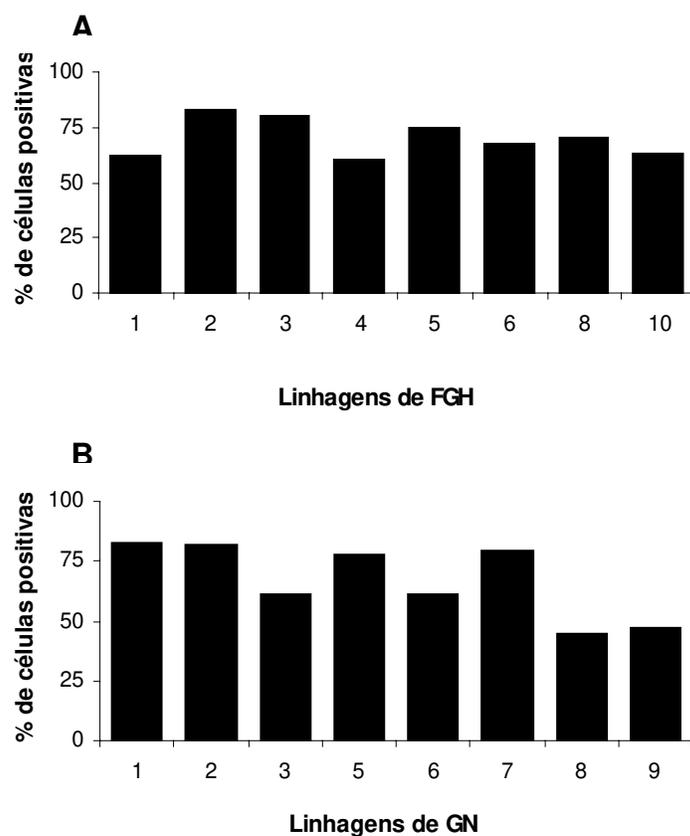
### 5.1.2 – Expressão dos marcadores de proliferação Ki-67 e PCNA

Reações imunocitoquímicas para detecção do antígeno nuclear Ki-67 foram realizadas nas culturas de FGH e de GN, previamente incubadas por 48 horas em DMEM com 0,1% de FBS e fixadas 28 horas após o início do tratamento com DMEM contendo 10% de FBS. Exemplos representativos de reações imunocitoquímicas para Ki-67 são mostrados na figura 6. Os gráficos mostrados nas figuras 7 A e B comparam as porcentagens de células positivas para Ki-67 entre as diferentes linhagens estudadas. Chama atenção o fato das células FGH 3, 5 e 6, que mais proliferaram nos experimentos de contagem celular (Fig. 2), não exibirem os maiores índices de positividade para Ki-67. Isto pode ter ocorrido pelo fato da proteína Ki-67 não ser expressa durante a fase G1 do ciclo celular (Gerdes, 1984; Lopez *et al.*, 1994; Starborg *et al.*, 1996). Desta forma, diferenças no tempo de duração do ciclo celular podem ter mascarado o resultado, pois as células foram fixadas simultaneamente. Tendo-se em vista estes resultados, este experimento foi repetido com células fixadas 48 horas após o plaqueamento. Após a contagem das células positivas, observou-se que houve concordância com os resultados das curvas de proliferação, ou seja, os maiores índices de positividade para Ki-67 foram encontrados nas células FGH 3, 5 e 6 (Fig. 8).

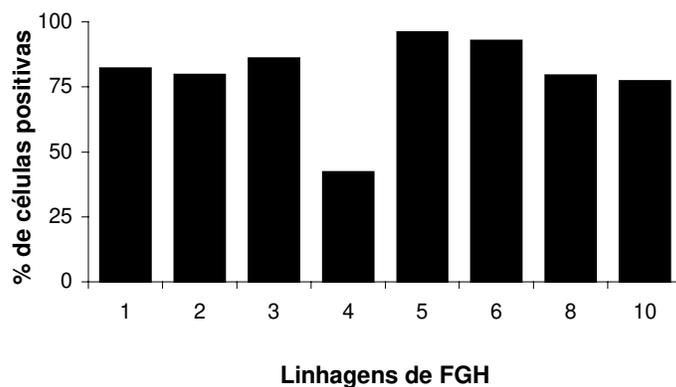
As reações imunocitoquímicas para a proteína nuclear PCNA também exibiram um padrão de marcação exclusivamente nuclear (Fig. 9), sendo os resultados muito semelhantes aos obtidos com os anticorpos contra a proteína Ki-67 (Fig. 10). Portanto, levando-se em consideração os experimentos descritos acima, fica evidente que dentre as oito linhagens de FGH estudadas, FGH 3, 5 e 6 são as que crescem mais rápido nas condições de cultura utilizadas neste trabalho.



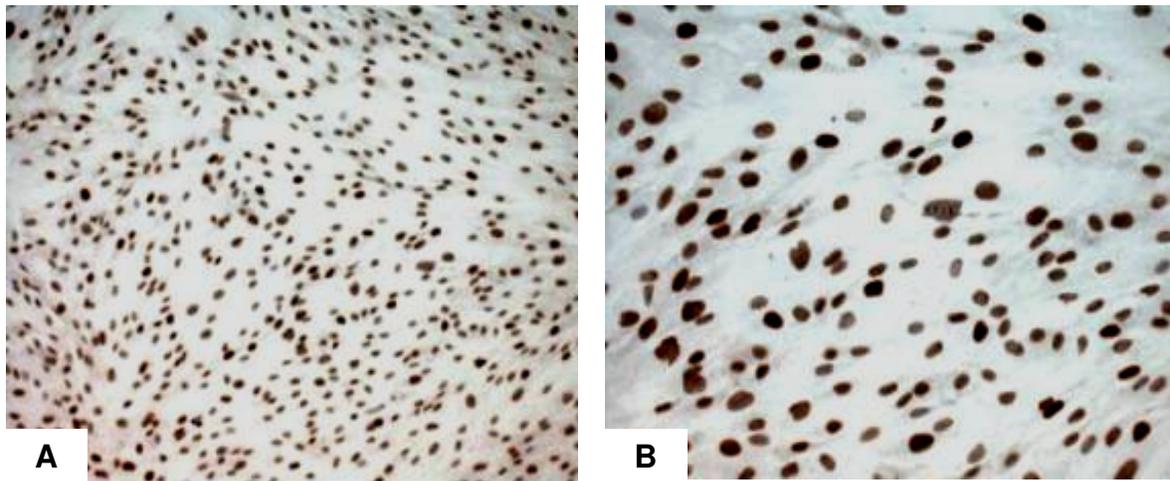
**Fig. 6** – Reação imunocitoquímica para detecção de Ki-67 em fibroblastos fixados com etanol a 70%, mostrando marcação nuclear específica (aumento original: A - 100X e B - 400X).



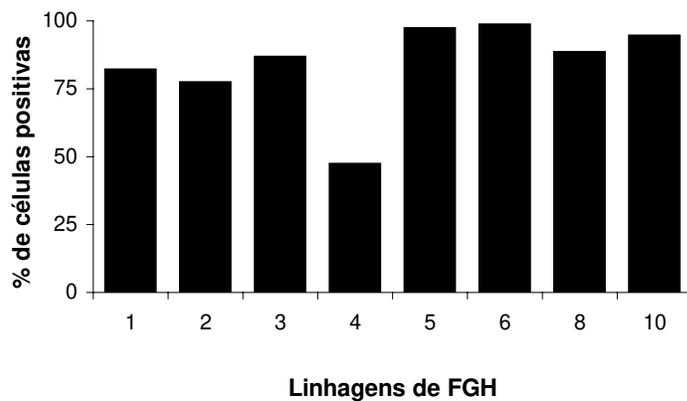
**Fig. 7** – Índices de positividade para a proteína Ki-67 dos fibroblastos de FGH (A) e GN (B), obtidos pela contagem dos núcleos positivos de culturas fixadas 28 horas após o término do período de sincronização.



**Fig. 8** – Índices de positividade para Ki-67 em fibroblastos de FGH não sincronizados. As linhagens que apresentaram maior número de células positivas foram as FGH 3, 5 e 6.



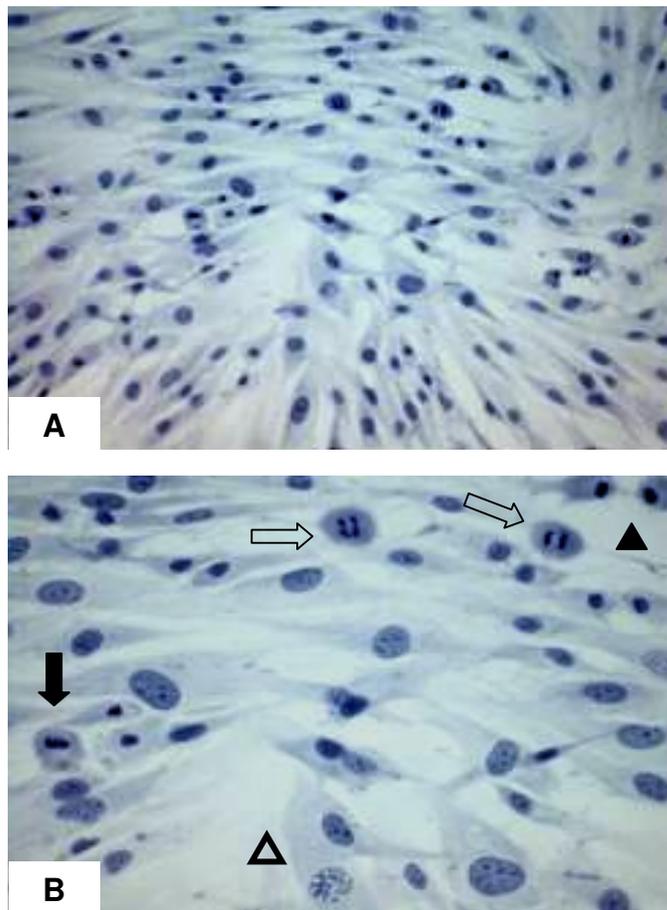
**Fig. 9** - Reações imunocitoquímicas para evidência da proteína PCNA em fibroblastos fixados com etanol a 70% (aumento original: A - 100X e B - 200X).



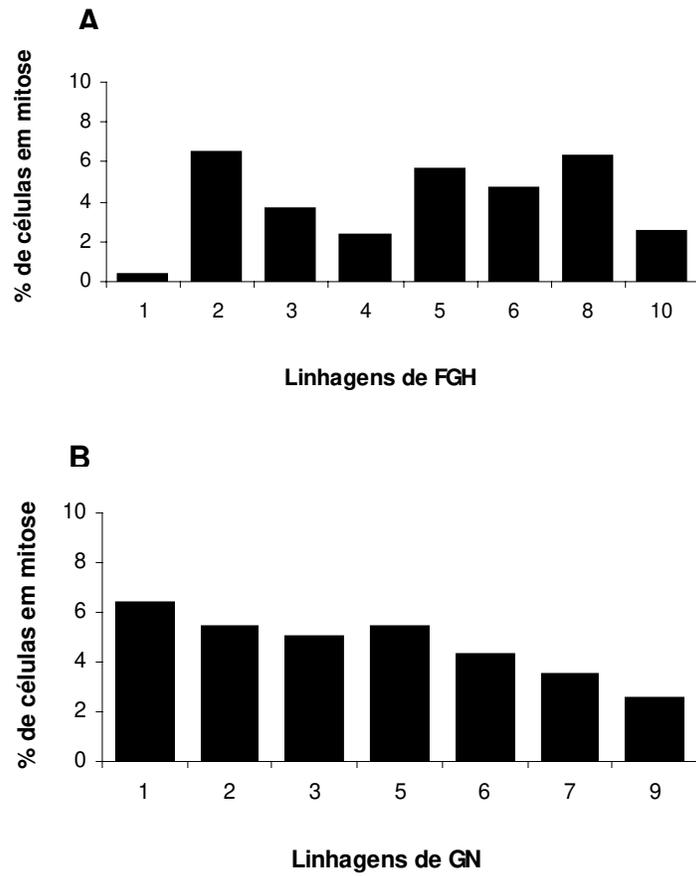
**Fig. 10** – Índices de positividade para a proteína PCNA de fibroblastos de FGH não sincronizados. Os resultados foram semelhantes aos mostrados na Fig. 8 para Ki-67, a não ser pela linhagem FGH 10 que foi ligeiramente mais positiva que FGH 8.

### 5.1.3 – Índices mitóticos

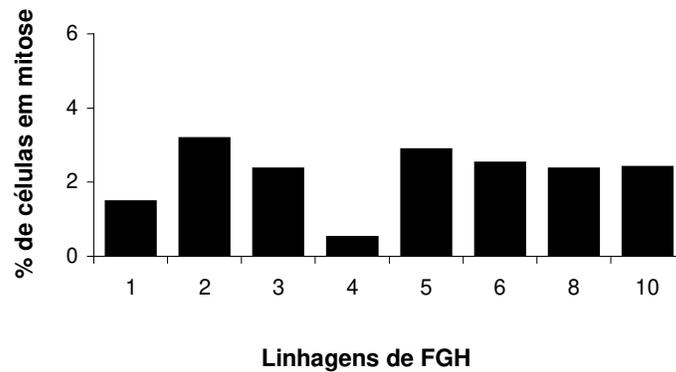
Os índices mitóticos foram calculados tanto para culturas celulares sincronizadas como não sincronizadas, a partir da contagem do número de figuras de mitose observadas nas células fixadas em lâminas para cultura celular (Figs. 11 A e B). Comparando-se os índices mitóticos mostrados na figura 12 A com a curva de crescimento da figura 2, pode-se notar que as células FGH 1 foram as que menos cresceram e, como esperado, mostraram o menor índice mitótico. Com relação às linhagens FGH 3, 5 e 6, que mais proliferaram nas curvas de crescimento, os índices mitóticos foram variáveis. Fato semelhante foi observado nas células da série GN, na qual GN 9 foi a que gerou contagens mais baixas nas curvas e teve o mais baixo índice mitótico (Figuras 3 e 12 B). Isto poderia ser explicado pela dificuldade em se encontrar a fase M do ciclo celular apenas 28 horas após o início da incubação com meio de cultura contendo 10% de FBS, em todas as linhagens. Entretanto, o mesmo procedimento foi realizado em células FGH 48 horas após o plaqueamento em DMEM acrescido de 10% de FBS e os resultados foram semelhantes, exceto para FGH 8 (Figuras 12 A e 13).



**Fig. 11** – Fibroblastos em cultura fixados com etanol 70% e corados com Hematoxilina de Carazzi para evidenciação de figuras de mitose. A cabeça de seta aberta aponta uma célula em prófase, a seta cheia uma célula em metáfase, as setas abertas núcleos de células em anáfase e a cabeça de seta cheia uma célula na telófase (aumento original: A - 200X; B - 400X).



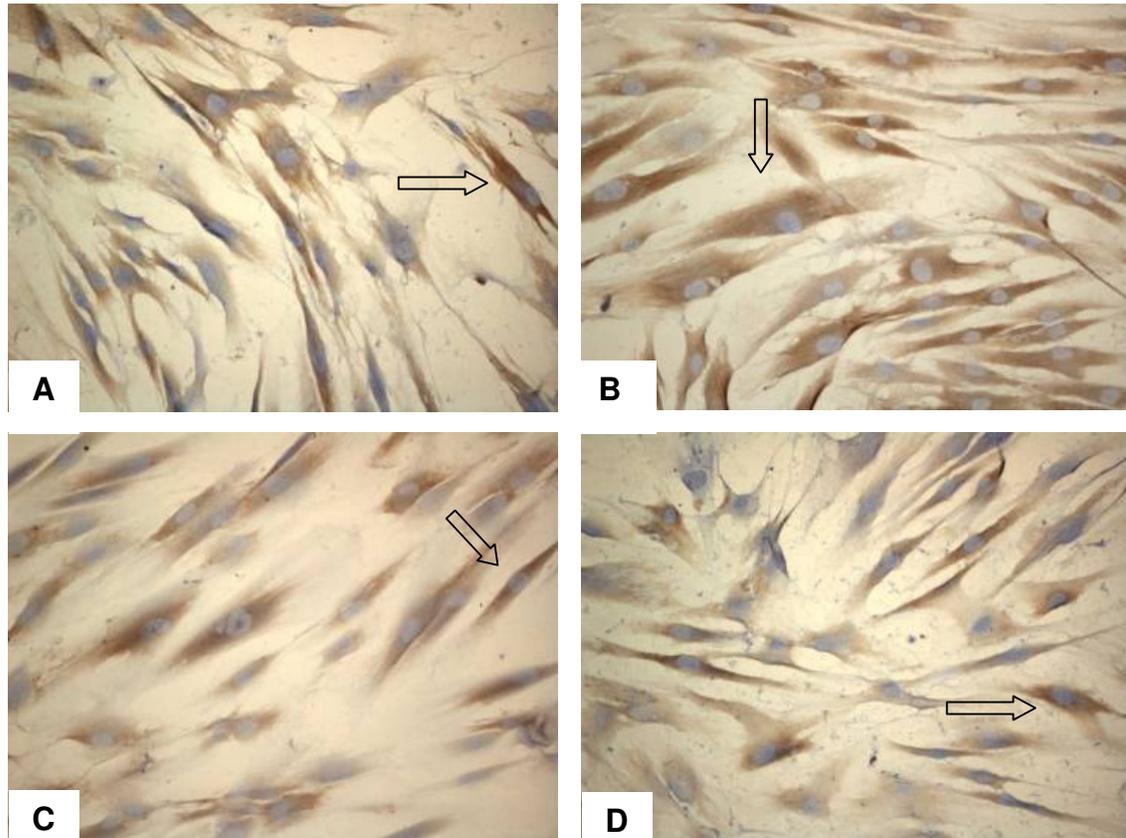
**Fig. 12** – Índices mitóticos dos fibroblastos de FGH (A) e de GN (B) sincronizados, fixados 28h após o início da incubação com DMEM contendo 10% de FBS.



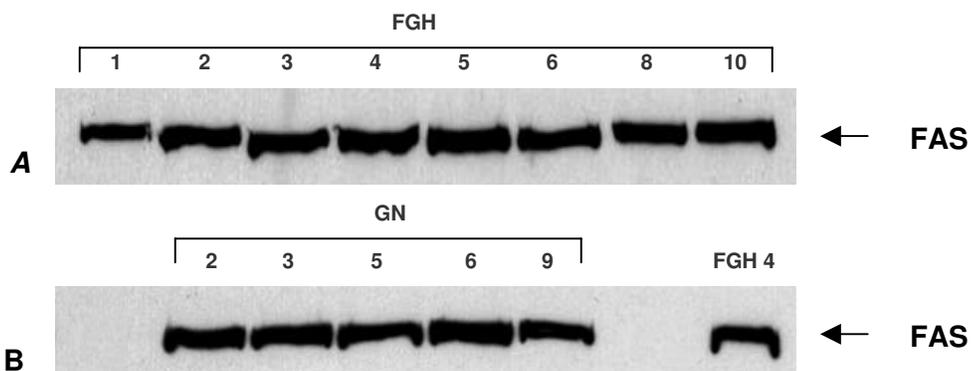
**Fig. 13** – Índices mitóticos de fibroblastos de FGH não sincronizados, fixados 48h após o plaqueamento.

## 5.2 – PRODUÇÃO DE FAS, RA, c-erb-B2 e EGFR

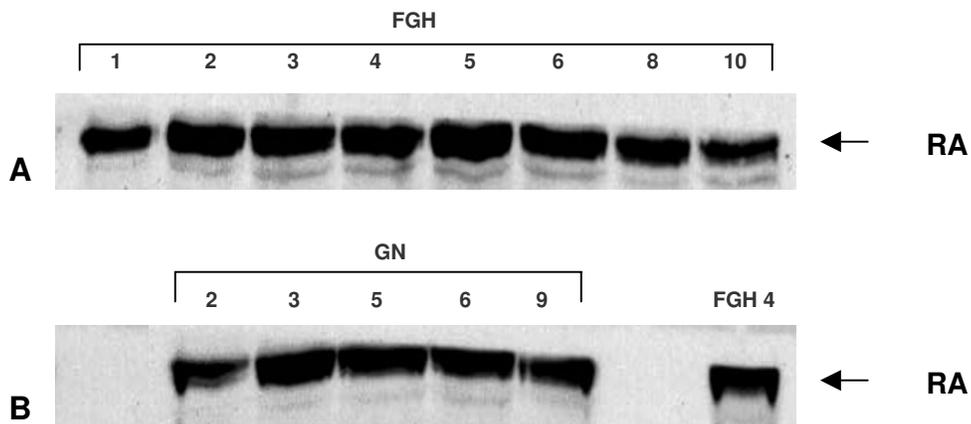
A expressão da enzima FAS em fibroblastos de FGH e GN foi inicialmente verificada por reações imunocitoquímicas, as quais exibiram um padrão de marcação exclusivamente citoplasmático e, algumas vezes, mais intenso na região perinuclear (Figs. 14 B e C). Todas as linhagens estudadas foram positivas para FAS, havendo algumas variações na intensidade das reações (Fig. 14). No intuito de comparar a quantidade de FAS produzida pelas linhagens de FGH e de GN, reações de western blot foram realizadas utilizando extratos protéicos obtidos tanto de células sincronizadas como não sincronizadas. A figura 15 mostra um western blot para FAS realizado com células sincronizadas, das quais as proteínas foram extraídas 14 horas após a adição do meio de cultura contendo 10% de FBS. A produção de FAS por fibroblastos de GN sincronizados foi maior do que a de fibroblastos de FGH (Figs. 15 A e B). Entretanto, não houve correlação entre a produção de FAS e os resultados de proliferação das células de FGH, exceto pelo fato da linhagem FGH 1, com menor potencial proliferativo (Fig. 2), apresentar a menor quantidade de FAS nos extratos protéicos. Apesar de não haver grandes variações quanto a proliferação das células GN, as linhagens GN 2, 3 e 6 se destacaram nas curvas de crescimento (Fig. 3) e seus extratos protéicos mostraram quantidades ligeiramente maiores da proteína FAS (Fig. 15 B), confirmadas através da densitometria das bandas (Fig. 17). Os mesmos lisados celulares foram utilizados para a análise da quantidade da proteína RA e, como pode ser observado nas figuras 16 e 17, houve maior produção de RA pelas células de FGH do que pelas linhagens de GN.



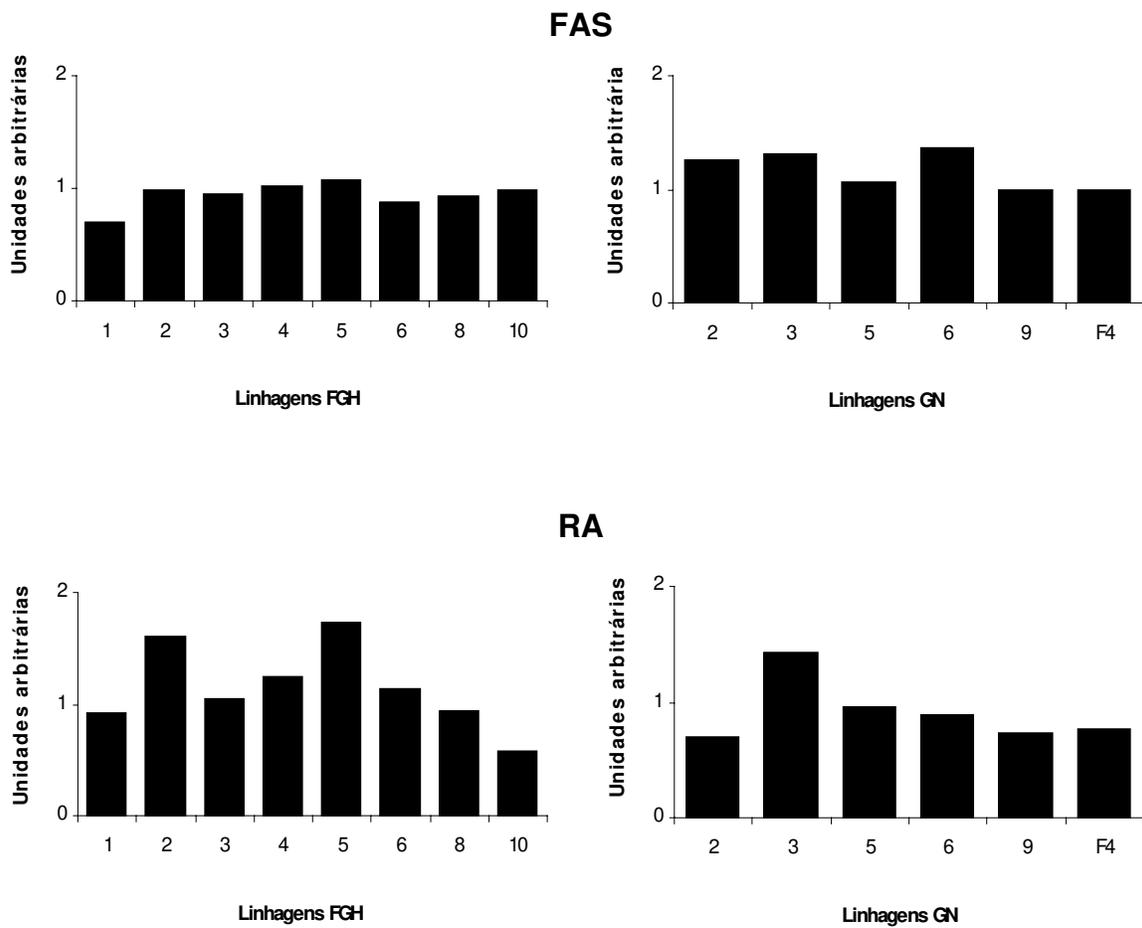
**Fig. 14** – Reações imunocitoquímicas com anticorpos específicos contra FAS em fibroblastos de FGH (A e B) e de GN (C e D). A marcação foi citoplasmática com intensidades variáveis, sendo algumas vezes mais intensa na região perinuclear (setas). **A** – FGH 1; **B** – FGH 6; **C** - GN 9; **D** – GN 3; (aumento original: 100X).



**Fig. 15** – Western blots realizados com anticorpos anti-FAS em extratos protéicos de células FGH (A) e GN (B) preparados 14 horas depois do início da incubação com meio contendo 10% de FBS.



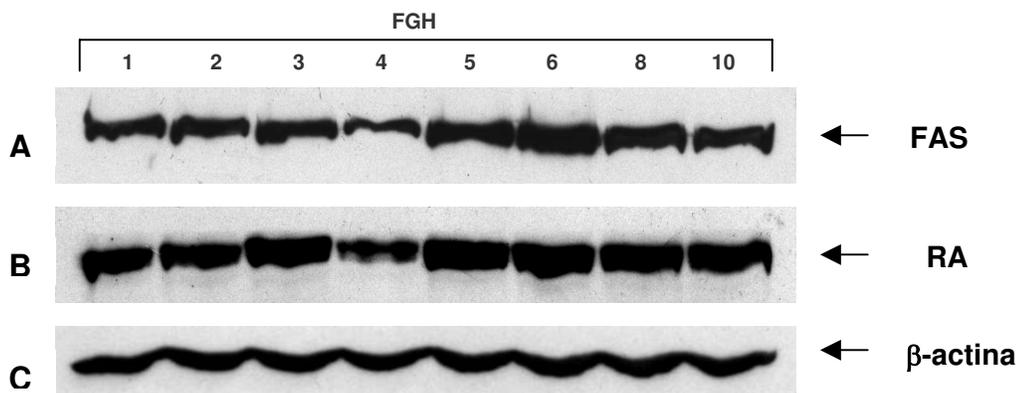
**Fig. 16** – Imunodeteccção da proteína RA nos mesmos lisados celulares da figura 15. De uma maneira geral, as bandas de RA foram mais intensas em células FGH (A) do que em GN (B).



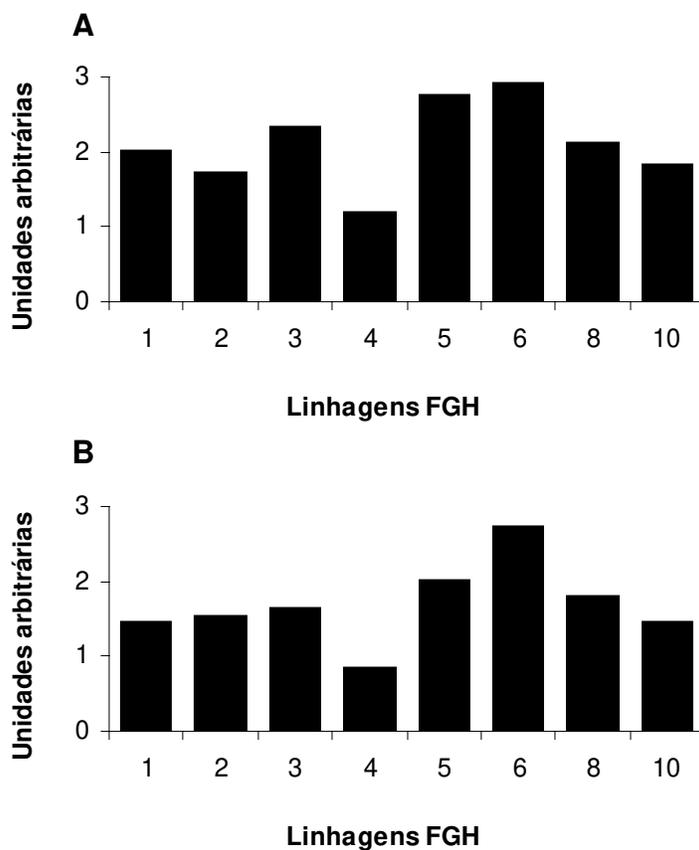
**Fig. 17** – Análise densitométrica das respectivas reações de western blot contra FAS e RA mostradas nas figuras 15 e 16.

A análise das amostras protéicas de fibroblastos de FGH obtidas a partir de células não sincronizadas, numa confluência de aproximadamente 80%, mostrou uma maior variação na produção de FAS (Fig. 18 A), a qual acompanhou, pelo menos em parte, os índices de proliferação. Linhagens que apresentaram um alto índice de positividade para Ki-67 expressaram quantidades maiores de FAS e as que tiveram baixos índices mostraram produção mais baixa de FAS. Uma correlação parcial pôde também ser notada com as reações imunocitoquímicas para PCNA e com as curvas de proliferação, com exceção das linhagens FGH 8 e 10. Os western blots com anticorpos contra RA nos extratos protéicos dos fibroblastos de FGH não sincronizados (Fig. 18 B) mostraram um padrão muito semelhante àquele encontrado para a proteína FAS nas mesmas células (Fig. 18 A). A similaridade das quantidades de FAS e RA fica evidente também nas análises densitométricas das respectivas bandas protéicas, sendo a linhagem FGH 1 a única que não mantém esta correlação (Fig. 19).

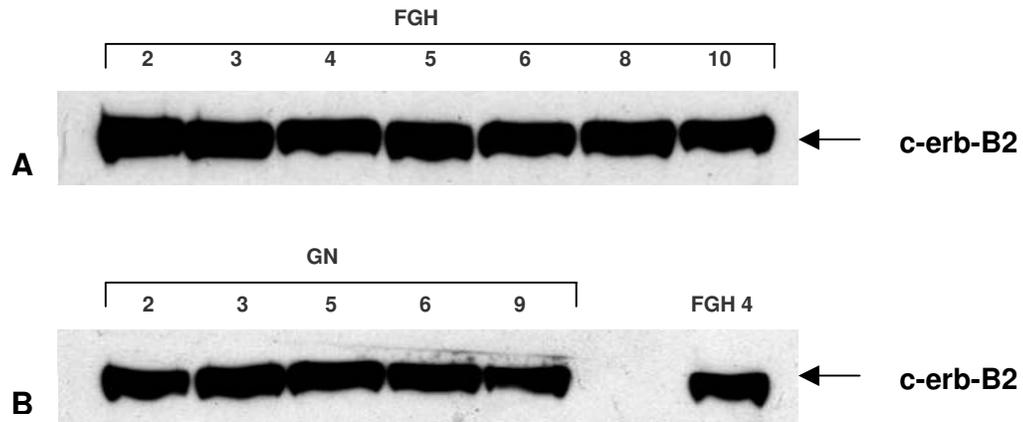
Reações de western blot para a detecção do receptor de superfície c-erb-B2 mostraram bandas intensas, sem grandes variações, nos extratos protéicos de fibroblastos de FGH e GN sincronizados, assim como nas linhagens FGH com crescimento não sincronizado (Figs. 20 e 21). A expressão de c-erb-B2 foi também estudada por reações imunocitoquímicas, que mostraram um padrão de positividade citoplasmático de intensidade semelhante em todas as linhagens estudadas (Fig. 22). A proteína EGFR não foi detectada nas linhagens de FGH pelos ensaios de western blot.



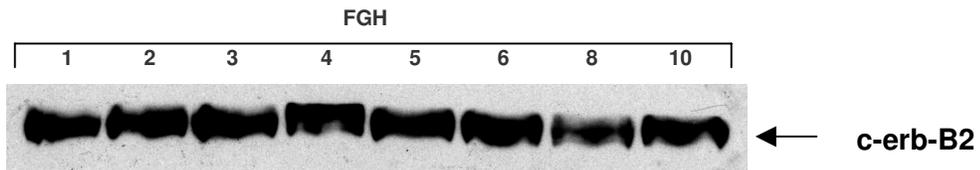
**Fig. 18** – Reação de western blot com anticorpos anti-FAS (A) e anti-RA (B) em extratos protéicos preparados a partir de fibroblastos de FGH em cultura com crescimento não sincronizado. A parte inferior da figura mostra o controle da normalização da quantidade de extrato protéico em cada canaleta, realizado com anticorpos contra  $\beta$ -actina (C).



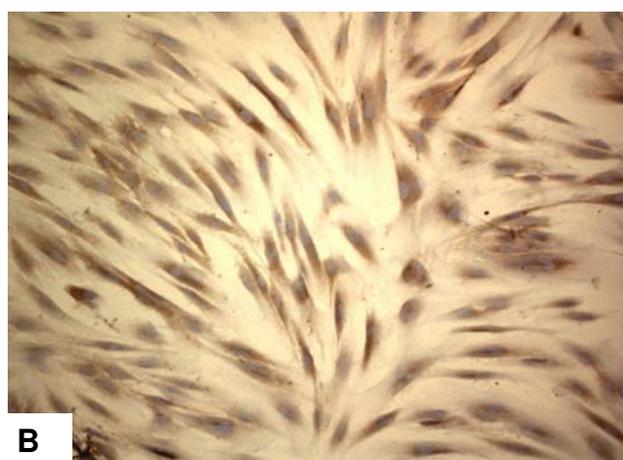
**Fig. 19** – Análise densitométrica das bandas de FAS (A) e de RA (B) obtidos nas reações de western blot da figura 18, confirmando o mesmo padrão de intensidade.



**Fig. 20** – Western blots realizados com anticorpos anti-c-erb-B2 em extratos protéicos de células FGH e GN preparados 14 horas depois do início da incubação com meio contendo 10% de FBS.



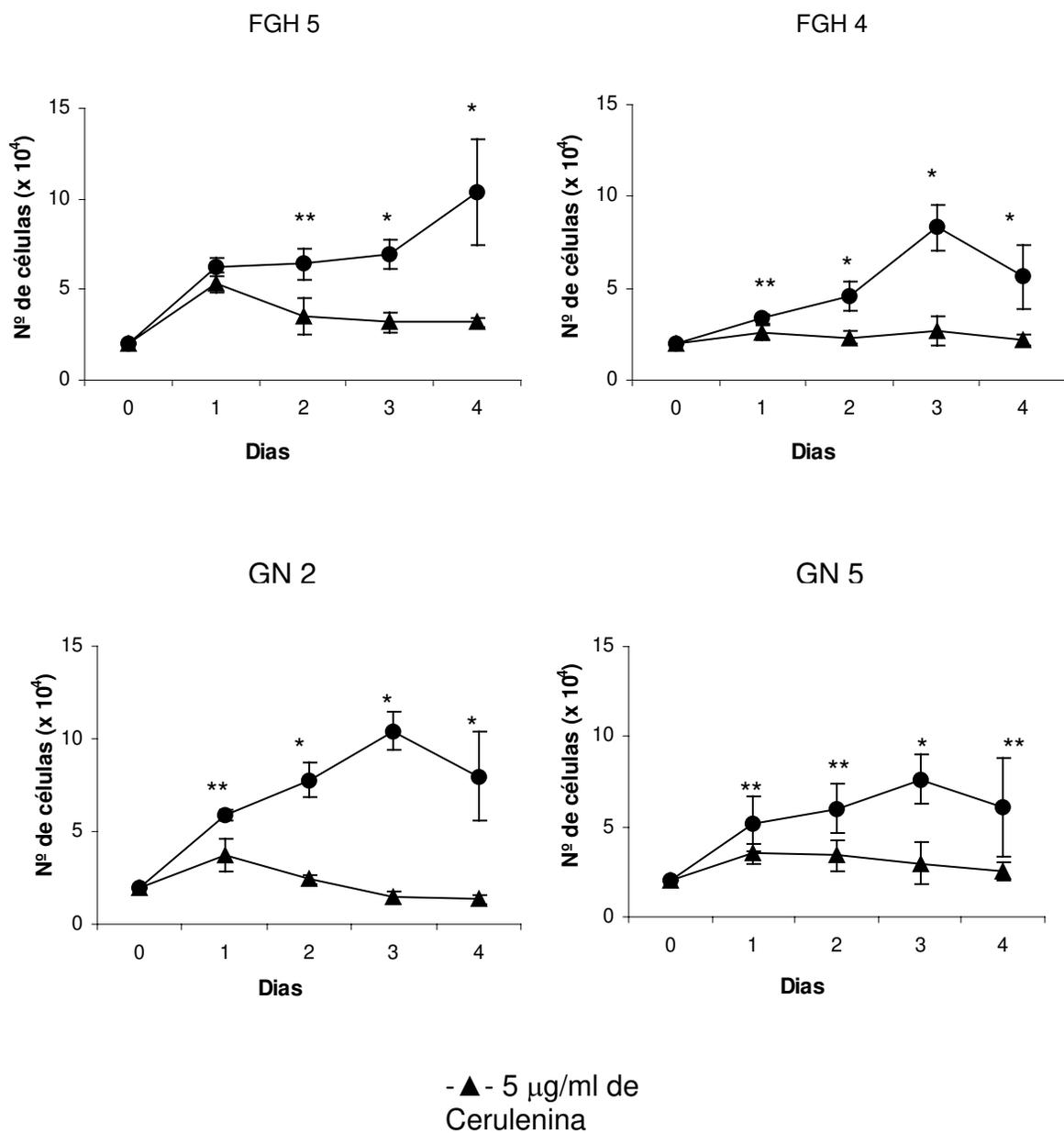
**Fig. 21** – Detecção da proteína c-erb-B2 nos extratos protéicos de células FGH obtidos de culturas com crescimento não sincronizado.



**Fig. 22** – Reações imunocitoquímicas realizadas com anticorpos contra c-erb-B2 em células FGH 1 (A) e GN 9 (B), mostrando uma marcação citoplasmática, mais intensa na linhagem FGH (aumento original: 100X).

### **5.3 – EFEITO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE FAS SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE FGH E GN.**

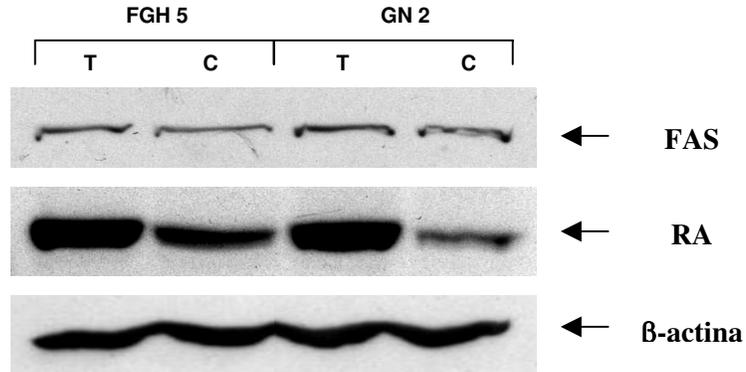
Considerando-se os resultados anteriores, que sugerem que FAS seja importante para a proliferação das células FGH, foram selecionadas as linhagens FGH 4 e 5 e GN 2 e 5 para tratamento com o cerulenina, um inibidor específico da atividade de FAS. Destas linhagens, FGH 5 e GN 2 tiveram alta proliferação, enquanto que FGH 4 e GN 5 exibiram baixa taxa de crescimento (Figs. 2 e 3). Como pode-se notar nos gráficos de crescimento celular mostrados na figura 23, a incubação destas células com meio de cultura contendo 10% de FBS e 5 $\mu$ g/ml de cerulenina inibiu a proliferação de todas as linhagens de maneira semelhante. Vale a pena salientar aqui que até 48 horas após o início do experimento as células tratadas com cerulenina proliferaram um pouco menos que os respectivos controles, mas após este período o crescimento celular foi reduzido. Na linhagem GN 2 (Fig. 23) o número de células após 72 horas chegou a ser inferior à quantidade de fibroblastos plaqueadas no início do experimento, provavelmente devido à morte por apoptose.



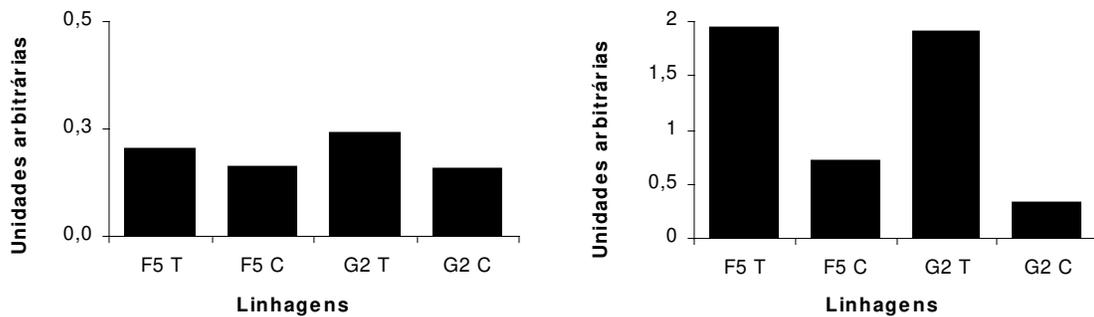
**Fig. 23** – Curvas de crescimento de fibroblastos tratados ou não com cerulenina, um inibidor natural da atividade de FAS. Houve redução significativa da proliferação celular tanto nas células de FGH como nas células de GN após o bloqueio da síntese de ácidos graxos (Mann-Whitney: \* p < 0,001; \*\* p < 0,05).

#### **5.4 – EFEITO DA TESTOSTERONA SOBRE A PRODUÇÃO DE FAS EM FIBROBLASTOS DE FGH E GN.**

Tendo-se em vista que os andrógenos são capazes de regular a produção de FAS em células de câncer de próstata (Swinnen *et al.*, 1997a; Swinnen *et al.*, 1997b) assim como de estimular a proliferação das células FGH (Coletta *et al.*, 2002) e que os experimentos mostrados no presente trabalho mostraram quantidades semelhantes de FAS e RA nas linhagens FGH estudadas, as células com maior potencial proliferativo (FGH 5 e GN 2) foram tratadas com 10nM de DHT por 48 horas. Após a extração das proteínas, reações de western blot mostraram que tanto as células FGH como as GN respondem ao estímulo induzido por DHT, aumentando a expressão de RA e de FAS (Fig. 24). No entanto, observa-se um aumento acentuado na expressão do RA, o que não ocorre com FAS. Um achado interessante foi o fato do tratamento com DHT estimular mais a produção de FAS nos fibroblastos GN2, em comparação com os de FGH5 (Fig. 25).



**Fig. 24** – Reações de western blot para as proteínas FAS, RA e  $\beta$ -actina em células tratadas (T) com DHT e seus respectivos controles com etanol absoluto, veículo utilizado para a dissolução da DHT (C). Observe que a DHT estimulou fortemente a expressão de RA tanto em células FG5 como em GN. A produção de FAS também foi aumentada pelo tratamento com DHT, porém em menor escala que o RA.



**Fig. 25** – Análise densitométrica dos western blots mostrados na figura 24.

## 6 – DISCUSSÃO

A FGH é uma doença genética cuja principal característica clínica é o crescimento lento, progressivo e indolor da gengiva, resultando em dificuldades na mastigação, higienização bucal e problemas estéticos, além de favorecer a inflamação gengival e periodontal. Hart *et al.* (1998) descreveram uma alteração no cromossomo 2p21-p22 na análise genética de uma família brasileira portadora de FGH, a qual não foi confirmada na família que deu origem às células utilizadas neste trabalho (Hart *et al.*, 2000). Xiao *et al.* em 2001 relataram a presença de um segundo locus alterado no cromossomo 5q13-q22 em uma família portadora de FGH que não apresentava a alteração no cromossomo 2p21-p22. Mais recentemente, Hart *et al.* (2002) relataram a presença de uma mutação no gene *SOS1*, presente no cromossomo 2p21-22, sugerindo que esta mutação seja responsável pelo aumento gengival observado na FGH1. A proteína codificada por este gene é responsável pela ativação da proteína Ras após estímulo induzido por receptores de superfície com atividade de tirosina-quinase (Hart *et al.*, 2002). Uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Patologia Bucal da FOP-UNICAMP é o estudo da patogenia da FGH. Estes estudos iniciaram com a caracterização detalhada de uma família portadora de FGH, em sua forma autossômica dominante, com 132 membros e 50 indivíduos afetados (Bozzo *et al.*, 1994). Subseqüentemente, vários outros trabalhos foram realizados (Coletta *et al.*, 1998; Coletta *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2001; Barros *et al.*, 2001; Coletta *et al.*, 2002; Araújo *et al.*, 2003) e seus resultados, em conjunto, sugerem que exista uma vantagem proliferativa dos fibroblastos da FGH, em comparação com as células derivadas de GN, associada a um acúmulo de proteínas da matriz extracelular do tecido conjuntivo gengival.

Diversos autores têm apontado a síntese endógena de ácidos graxos como necessária para a manutenção de um fenótipo maligno, conferindo às células vantagens proliferativas. A expressão de FAS, a principal enzima responsável pela síntese de ácidos graxos, está aumentada em diversas

neoplasias malignas humanas, como o câncer de mama (Kuhajda *et al.*, 1994; Pizer *et al.*, 1996b; Milgraum *et al.*, 1997), próstata (Swinnen *et al.*, 1997a; Myers *et al.*, 2001), cólon (Li *et al.*, 2000), endométrio (Pizer *et al.*, 1998a), ovário (Alò *et al.*, 2000), tireóide (Sekiguchi *et al.*, 2001), pulmão (Piyathilake *et al.*, 2000; Gabrielson *et al.*, 2001), boca (Krontiras *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004), esôfago (Nemoto *et al.*, 2001), melanoma (Innocenzi *et al.*, 2003), sarcomas de tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003), retinoblastoma (Camassei *et al.*, 2003a), neuroblastoma (Slade *et al.*, 2003), nefroblastoma (Camassei *et al.*, 2003b) e leucemia (Pizer *et al.*, 1996a). Para alguns destes tumores, a expressão anormalmente alta de FAS está positivamente associada à agressividade da doença e a um pior prognóstico, como por exemplo, nas neoplasias de mama, próstata, ovário, sarcomas de tecidos moles, retinoblastoma, nefroblastoma e melanoma (Jensen *et al.*, 1995; Alò *et al.*, 1996; Alò *et al.*, 2000; Takahiro *et al.*, 2003; Camassei *et al.*, 2003a; Camassei *et al.*, 2003b; Innocenzi *et al.*, 2003).

A idéia de que a atividade e a expressão de FAS sejam importantes para a proliferação celular tem sido confirmada por vários estudos laboratoriais utilizando inibidores específicos de sua atividade, como a cerulenina e o C75. O bloqueio de FAS leva a uma inibição da síntese de DNA e, conseqüentemente, da progressão da fase S em células derivadas de neoplasias malignas (Pizer *et al.*, 1996b; Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998b; Kuhajda, 2000; Li *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2003). O mecanismo biológico envolvido na comunicação entre o controle do ciclo celular e a biossíntese de lipídios não é conhecido até o momento. Entretanto, uma maior produção de ácidos graxos parece ser necessária para a biogênese das membranas das células tumorais em rápida divisão, pois ácidos graxos de cadeias longas produzidos a partir dos precursores estearato e palmitato, gerados pela FAS, são essenciais para a divisão celular (Hannun e Obeid, 2002). Além do mais, maior expressão e atividade elevada de FAS são necessárias para a produção dos fosfolipídios de membrana das células LNCaP, derivadas de tumor prostático (Swinnen *et al.*, 2003). Segundo Baron *et al.* (2004), alterações na composição lipídica das membranas celulares, como resultado de

uma alta produção de FAS, poderiam interferir com diversos processos celulares, como as vias de transdução de sinal que, por sua vez, podem ter efeito na progressão do ciclo celular.

Estudos com os inibidores específicos de FAS mostram ainda que essas substâncias exercem uma citotoxicidade seletiva em modelos experimentais para o tratamento de neoplasias malignas, com efeitos colaterais mínimos (Kuhajda *et al.*, 2000; Loftus *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2001). Segundo Kuhajda *et al.* (2000), isto ocorre porque na maioria dos tecidos normais a expressão de FAS é baixa, o que coloca esta enzima como um alvo promissor para futuras terapias anti-neoplásicas. No entanto, é importante ressaltar que a deleção do gene que codifica FAS (*FASN*) em camundongos impede o desenvolvimento dos embriões, provocando a morte destes antes da implantação no útero (*FAS* - / -) ou durante o desenvolvimento embrionário (*FAS* + / -), sugerindo que terapias baseadas no bloqueio de FAS possam ser altamente teratogênicas (Chirala *et al.*, 2003). Para contornar estes efeitos, ou mesmo uma eventual citotoxicidade em tecidos normais, a inibição indireta de FAS em células derivadas de adenocarcinoma prostático (LNCaP) está sendo estudada no laboratório do Dr. Massimo Loda, no Dana-Farber Cancer Institute (Harvard Medical School, Boston, EUA). Este grupo mostrou recentemente que a proteína FAS pode ser degradada pelo sistema ubiquitina-proteossomo e identificou a enzima responsável pela remoção das suas etiquetas de ubiquitina, denominada de USP2 (“Ubiquitin Specific Protease 2”). USP2 também tem sua expressão aumentada no câncer de próstata, no qual atua prolongando a meia-vida da proteína FAS (Graner *et al.*, 2004), constituindo-se provavelmente num melhor alvo terapêutico do que a própria FAS, caso FAS seja realmente o único substrato para esta enzima desubiquitinante.

Embora muitos trabalhos considerem FAS importante no desenvolvimento de neoplasias malignas, não existem estudos sobre a participação de FAS em processos proliferativos de natureza não neoplásica, como por exemplo a FGH. Experimentos realizados em nosso e em outros laboratórios demonstraram que na FGH ocorre um desequilíbrio entre a síntese e

a degradação das macromoléculas componentes da matriz extracelular produzida pelos fibroblastos gengivais (Tipton *et al.*, 1997; Coletta *et al.*, 1999; Martelli-Junior *et al.*, 2003). De fato, um aumento da síntese de colágeno tipo I associado à inibição de enzimas da família das metaloproteinases de matriz (MMPs) é, em parte, responsável pelo crescimento gengival visto na FGH (Martelli-Junior *et al.*, 2003). Paralelamente ao acúmulo de matriz extracelular, um aumento do número de fibroblastos pode também ser importante na etiologia desta doença, pois estas células proliferam com maior rapidez quando comparadas com fibroblastos de gengiva normal (Tipton *et al.*, 1997; Coletta *et al.*, 1998).

No presente trabalho, os fibroblastos com maior potencial de crescimento foram os de FGH, o que está de acordo com relatos anteriores (Tipton *et al.*, 1997; Coletta *et al.*, 1998). Entretanto, ao contrário das células GN, uma grande variabilidade entre as linhagens FGH foi notada, provavelmente devido à seleção de sub-populações distintas presentes no tecido conjuntivo gengival de pacientes portadores de FGH durante o estabelecimento das culturas primárias, como sugerido por Hassel *et al.* (1983). Experimentos de citometria de fluxo serão importantes para se conhecer a distribuição destes fibroblastos em cada fase do ciclo celular e gerar uma comparação mais precisa sobre o crescimento de cada uma das linhagens. Levando-se em consideração estes resultados, o próximo objetivo deste trabalho foi verificar se FAS possui algum papel no crescimento destas células. Como esperado, os fibroblastos com a maior capacidade de crescimento em cultura (FGH 3, 5 e 6) exibiram maiores quantidades da proteína FAS nas reações de western blot. Isto foi observado nas culturas em crescimento não sincronizado, pois provavelmente nas culturas sincronizadas não houve tempo para que o estímulo dos fatores de crescimento e/ou hormônios presentes no FBS fosse refletido nos níveis da proteína FAS. Ensaios de RT-PCR nas células sincronizadas provavelmente já mostrariam aumentos na quantidade dos RNAs mensageiros para FAS.

Em células derivadas de carcinoma de próstata (LNCaP), tanto andrógenos como o fator de crescimento EGF estimulam a transcrição de FAS

através de SREBPs (Swinnen *et al.*, 1997a, 2000), que se ligam aos elementos regulatórios de esteróides (SREs) e coordenam a expressão de múltiplos genes lipogênicos, incluindo FAS (Brown e Goldstein, 1997). Um trabalho de Swinnen *et al.* (1997b), com células de câncer de próstata, demonstrou que andrógenos estimulam a expressão de SREBPs e aumentam a quantidade da forma ativa deste fator de transcrição no núcleo. No presente trabalho, as quantidades de FAS nos extratos de células FGH sincronizadas não foram semelhantes às de RA provavelmente porque não houve tempo hábil para o estímulo de sua tradução. Além disso, as densitometrias das bandas do western blot com anticorpos anti-RA (Fig. 17) também não mostraram correlação com os índices de proliferação destas células (Figs. 2, 8 e 10), indicando que talvez nem mesmo RA tenha sido estimulado 14 horas após a re-adição do FBS às culturas. Entretanto, a expressão da proteína RA nos extratos protéicos de células FGH não sincronizadas (Fig. 19) foi muito semelhante à de FAS nos mesmos lisados celulares (Fig. 18), sugerindo que FAS esteja sob regulação de andrógenos nestas culturas. Desta forma, as células que mais responderam aos andrógenos presentes no FBS, aumentando a quantidade de RA, foram aquelas que produziram mais FAS e que apresentaram os mais altos potenciais proliferativos em nossas condições de cultura. Estes achados estão de acordo com experimentos anteriores do nosso grupo mostrando que a testosterona (DHT) estimula o crescimento de células FGH, o que não aconteceu na presença de anti-andrógenos (Coletta *et al.*, 2002). A administração de andrógenos a ratos castrados induziu a transcrição de FAS e outros genes lipogênicos na próstata ventral e glândulas lacrimais, a qual foi acompanhada por um aumento nos níveis de SREBPs, demonstrando que a regulação gênica de FAS através de andrógenos não ocorre somente em células neoplásicas, mas também em tecidos normais responsivos a andrógenos (Heemers *et al.*, 2003). Os resultados mostrados na figura 24 deste trabalho mostraram que o tratamento de células FGH e GN com DHT resultou em um grande aumento na quantidade da proteína RA, que foi acompanhado por um aumento da produção de FAS,

confirmando que a expressão desta última pode ser mediada por andrógenos em fibroblastos gengivais.

Vários fatores de crescimento e hormônios, como TGF- $\beta$ 1, glicocorticóides, FGF-1, EGF, estrógenos e progesterona são capazes de estimular a transcrição e a atividade de FAS (Hsu *et al.*, 1993; Kalkhoven *et al.*, 1994; Teruel *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 2001). Nas células de câncer de mama MCF-7 e T47D, estrógeno e progesterona estimulam o crescimento celular e ao mesmo tempo a expressão de FAS (Kalkhoven *et al.*, 1994). A inibição da expressão de TGF- $\beta$ 1 por oligonucleotídeos anti-sense, ou de sua atividade com anticorpos monoclonais é capaz de reduzir a proliferação das células derivadas de FGH (Andrade *et al.*, 2001), sugerindo que esta citocina seja importante na patogenia desta doença. Estudos para verificar se a redução da proliferação na ausência do estímulo de TGF- $\beta$ 1 ocorre pela diminuição da produção de FAS serão realizados em nosso laboratório, como continuação do presente trabalho. EGF é mais eficiente que andrógenos para estimular a expressão do gene que codifica FAS em células LNCaP (Swinnen *et al.*, 2000), entretanto, não foi possível neste estudo detectar a presença de EGFR nas células FGH ou GN. Por outro lado, experimentos de western blot com linhagens celulares provenientes de carcinomas espinocelulares de língua, revelaram que a produção de RA é muito baixa ou mesmo ausente, enquanto que EGFR e c-erb-B2 são altamente expressos, indicando um possível papel para seus ligantes no controle da expressão de FAS nestas células (Agostini *et al.*, 2004). No presente trabalho, bandas intensas correspondentes ao receptor de superfície c-erb-B2 foram encontradas em todas as linhagens, mas sem qualquer correlação com as variações na atividade proliferativa e com a produção de FAS. Não se pode, no entanto, descartar um papel para este receptor na proliferação de fibroblastos provenientes de FGH, principalmente tendo-se em vista a recente demonstração de que c-erb-B2 é capaz de estimular, através de SREBPs, a expressão de FAS em células epiteliais de mama em cultura (Kumar-Sinha *et al.*, 2003). FAS é altamente expressa em tumores de próstata andrógeno-independentes (Myers *et*

al., 2001; Pizer *et al.*, 2001), o que poderia ser explicado pela estimulação via c-erb-B2 (Lin *et al.*, 2003), o qual foi descrito por Signoretti *et al.* (2000) como um fator de sobrevivência para estas células.

O uso de inibidores da atividade de FAS tem sido sugerido como uma alternativa no tratamento anti-neoplásico, já que a expressão desta enzima é geralmente baixa em tecidos normais e alta em neoplasias malignas. A administração sistêmica de C75 a camundongos portadores de tumores xenográficos de mama resultou em uma inibição da síntese de ácidos graxos e importante atividade anti-tumoral, sem efeitos colaterais mesmo em tecidos com alta proliferação celular, como a medula óssea, o trato gastrointestinal, a pele ou os tecidos linfóides (Kuhajda *et al.*, 2000). Segundo este trabalho, a única alteração observada foi uma perda de peso transitória dos animais, efeito que foi detalhadamente descrito por Loftus *et al.* (2000), os quais mostraram um papel dos bloqueadores de FAS como inibidores de apetite com ação no sistema nervoso central. O tratamento de tumores xenográficos de ovário com inibidores de FAS causa uma marcante redução da síntese de ácidos graxos pelas células tumorais e regressão das lesões, aumentando significativamente a sobrevivência dos animais (Pizer *et al.*, 1996c). Estudos com linhagens celulares de câncer de mama, cólon, próstata e de leucemia, tratadas com cerulenina ou C75, demonstraram que ocorre uma inibição de FAS, com conseqüente bloqueio da síntese de DNA, culminando com a morte destas células por apoptose (Pizer *et al.*, 1996a, 1996b; Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998b; Kuhajda *et al.*, 2000). Zhou *et al.* (2003) demonstraram que C75 aumenta a oxidação de lipídios de membrana ao mesmo tempo que reduz a síntese de fosfolipídios, inibe a fase S do ciclo celular e induz a apoptose em células proliferantes. Estes mesmos autores também sugerem que a inibição de FAS, além de reduzir a síntese de membranas celulares, promove o acúmulo de malonil -CoA, o qual desencadearia o processo de apoptose.

No presente trabalho, o bloqueio da atividade de FAS em fibroblastos de FGH e GN com cerulenina provocou uma inibição da proliferação de todas as

linhagens. Observou-se que até aproximadamente 48 horas após o início do tratamento as células proliferaram de maneira semelhante aos controles, mas após este período o crescimento celular foi drasticamente reduzido. Na linhagem GN 2 (Fig. 23), por exemplo, o número de células após 72 horas chegou a ser inferior à quantidade plaqueada no início do experimento, provavelmente devido à morte celular por apoptose. Estes resultados mostram que FAS exerce um papel importante na proliferação tanto de células normais, como as de GN, como de células derivadas de FGH. Portanto, a atividade de FAS não é essencial apenas para o crescimento de células malignas, as quais a expressam em maior quantidade, sugerindo a necessidade de estudos mais detalhados sobre os efeitos de drogas bloqueadoras de FAS sobre células e tecidos não neoplásicos. Além do mais, ao contrário do esperado, a cerulenina inibiu de maneira semelhante o crescimento das células FGH, que expressaram maiores quantidades de FAS, e das células GN, que produziram pouca FAS.

Em resumo, os dados apresentados no presente trabalho mostram que as células FGH com maior potencial proliferativo produzem mais FAS do que as demais, num mecanismo regulado, pelo menos em parte, por testosterona. Além do mais, o bloqueio da atividade enzimática de FAS inibiu a proliferação de células FGH e GN, indistintamente. Mais estudos se fazem necessários para a compreensão da participação de FAS na patogenia da FGH e de outras doenças benignas caracterizadas por um aumento na proliferação celular.

## **7 – CONCLUSÕES**

1 – Algumas linhagens celulares estabelecidas a partir da gengiva de pacientes portadores de FGH proliferam mais do que fibroblastos de GN.

2 – Nas linhagens FGH 3, 5 e 6 há uma relação positiva entre a quantidade das proteínas FAS e RA e a proliferação celular em culturas não sincronizadas.

3 – A testosterona estimula a produção da proteína FAS em fibroblastos derivados de FGH e GN.

4 – Fibroblastos de FGH e GN expressam quantidades semelhantes do receptor c-erb-B2.

5 – O bloqueio da atividade de FAS com cerulenina inibe a proliferação de fibroblastos derivados de FGH e de GN.

6 – A proteína EGFR não foi detectada nas células estudadas, através das técnicas utilizadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

---

1. Agostini M, Silva SD, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, Loda M, Graner E. Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncology*. 2004; *in press*.
2. Alò PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U. Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer*. 1996; 77(3): 474-82.
3. Alò PL, Visca P, Framarino ML, Botti C, Monaco S, Sebastiani V, *et al*. Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. *Oncol. Rep.* 2000; 7(6): 1383-8.
4. Andrade CR, Cotrin P, Graner E, Almeida OP, Sauk JJ, Coletta RD. Transformation growth factor- $\beta$ 1 autocrine stimulation regulates fibroblast proliferation in hereditary gingival fibromatosis. *J Periodontol*. 2001; 72(12): 1726-33.
5. Araújo CSA, Graner E, Almeida OP, Sauk JJ, Coletta RD. Histomorphometric characteristics and expression of epidermal growth factor and its receptor by epithelial cells of normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis. *J Periodont Res*. 2003; 38(3): 237-41.
6. Bantis A, Giannopoulos A, Gonidi M, Liossi A, Aggelonidou E, Petrakakou E, Athanassiades P, Athanassiadou P. Expression of p120, Ki-67 and PCNA as

---

<sup>1</sup> De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

proliferation biomarkers in imprint smears of prostate carcinoma and their prognostic value. **Cytopathology**. 2004; 15(1): 25-31.

7. Baron A, Migita T, Tang D, Loda M. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? **J Cell Biochem**. 2004; *in press*

8. Barros SP, Merzel J, Araújo VC, Almeida OP, Bozzo L. Ultrastructural aspects of connective tissue in hereditary gingival fibromatosis. **Oral Surg, Oral Medic, Oral Pathol**. 2001; 92(1): 78-82.

9. Becker W, Collings CK, Zimmerman ER, De La Rosa M, Singdahlsen D. Hereditary gingival fibromatosis. **Oral Surg, Oral Medic, Oral Pathol**. 1967; 24(3): 313-8.

10. Berne RM, Levy MN. **Physiology**. 4. ed. St. Louis: Mosby, Inc; 1998: 877-82.

11. Bozlu M, Orhan D, Baltaci S, Yaman O, Elhan AH, Tulunay O, Muftuoglu YZ. The prognostic value of proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and nucleolar organizer region in transitional cell carcinoma of the bladder. **Int Urol Nephrol**. 2002; 33(1):59-66.

12. Bozzo L, Almeida OP, Scully C, Aldred MJ. Hereditary gingival fibromatosis. Report of an extensive four-generation pedigree. **Oral Surg, Oral Medic, Oral Pathol**. 1994; 78(4): 452-4.

13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. 1976; 72: 448-54.

14. Brink J, Ludtke SJ, Yang CY, Gu Z, Wakil SJ, Chiu W. Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. **PNAS**. 2002; 99(1):138-43.
15. Brinkmann AO. Steroid hormone receptors: activators of gene transcription. **J Paediatr Endocrinol**. 1994; 7(4): 275-82.
16. Brown RS, Trejo PM, Weltman R, Pinero G. Treatment of a patient with hereditary gingival fibromatosis: a case report. **Special Care in Dentistry**. 1995; 15(4): 149-53.
17. Brown MS, Goldsrein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell**. 1997; 89(3): 331-40.
18. Brusselmans K, De Shrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells. **Int J Cancer**. 2003; 106(6): 856-62.
19. Camassei FD, Cozza R, Acquaviva A, Jenkner A, Rava L, Garieri R, *et al*. Expression of the lipogenic enzyme fatty acid synthase (FAS) in retinoblastoma and its correlation with tumor aggressiveness. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 2003a; 44(6): 2399-2403.
20. Camassei, FD, Jenkner A, Rava L, Bosman C, Francalanci P, Donfrancesco A, Alò PL. Expression of the lipogenic enzyme fatty acid synthase (FAS) as a predictor of poor outcome in nephroblastoma: an interinstitutional study. **Med Pediatr Oncol**. 2003b; 40(5): 302-8.

21. Cherchi PL, Marras V, Capobianco G, Ambrosini G, Piga MD, Fadda GM, Rosas N, Dessole S. Prognostic value of p53, c-erb-B2 and MIB-1 in endometrial carcinoma. ***Eur J Gynaecol Oncol.*** 2001; 22(6): 451-3.
22. Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K, *et al.* Fatty acid synthase is essential in embryonic development: Fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die *in utero*. ***PNAS.*** 2003; 100(11): 6358-63.
23. Coletta RD, Almeida OP, Graner E, Page RC, Bozzo L. Differential proliferation of fibroblasts cultured from hereditary gingival fibromatosis and normal gingiva. ***J Periodontol Res.*** 1998; 33(8): 469-75.
24. Coletta RD, Almeida OP, Reynolds MA, Sauk JJ. Alteration in expression of MMP-1 and MMP-2 but not TIMP-1 and TIMP-2 in hereditary gingival fibromatosis is mediated by TGF- $\beta$ 1 autocrine stimulation. ***J Periodontol Res.*** 1999a; 34(8): 457-63.
25. Coletta RD, Almeida OP, Ferreira LR, Reynolds MA, Sauk JJ. Increase in expression of Hsp47 and collagen in hereditary gingival fibromatosis is modulated by stress and terminal procollagen N-propeptides. ***Connect Tissue Res.*** 1999b; 40(4): 237-49.
26. Coletta RD, Reynolds MA, Martelli-Junior H, Graner E, Almeida OP, Sauk JJ. Testosterone stimulates proliferation and inhibits interleukin-6 production of normal and hereditary gingival fibromatosis fibroblasts. ***Oral Microbiology Immunol.*** 2002; 17(3): 186-92.

27. Collan Y, Ranta H, Vartio T, Perheentupa J, Raeste AM. Histochemical and biochemical study of hereditary fibrous hyperplasia of the gingiva. **J Dent Res.** 1982; 90(1): 20-8.
28. Cox ES. Who binds wins: competition for PCNA rings out cell-cycle changes. **Cell Biol.** 1997; 7: 493-8.
29. Cuestas-Carnero R, Bornancini CA. Hereditary generalized gingival fibromatosis associated with hypertrichosis: report of five cases in one family. **J Oral Maxillofac Surg.** 1988; 46(5): 415-20.
30. Danesh-Meyer MJ, Holborow DW. Familial gingival fibromatosis: a report of two patients. **New Zeland Dent J.** 1993; 89(398): 119-22.
31. Dorfman RI, Shipley RA. **Androgens: biochemistry, physiology and clinical significance.** New York: Wiley; 1956: 152-217 *apud* Traish AM, Kim N, Min K, Munarriz R, Goldstein I. Role of androgens in female genital sexual arousal: receptor expression, structure, and function. **Fertility and Sterility.** 2002; 77: S11-17.
32. Emerson TG. Hereditary gingival hyperplasia. A family pedigree of four generations. **Oral Surg, Oral Medic, Oral Pathol.** 1965; 19(1): 1-9.
33. Estrada M, Espinosa A, Muller M, Jaimovich E. Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. **Endocrinology.** 2003; 144(8): 3586-97.
34. Fletcher JP. Gingival abnormalities of genetic origin: a preliminary communication with special reference to hereditary generalized gingival fibromatosis. **J Dent Res.** 1966; 45: 597-612.

35. Forabosco A, Criscuolo M, Coukos G, Uccelli E, Weinstein R, Spinato S, Botticelli A, Volpe A. Efficacy of hormone replacement therapy in postmenopausal women with oral discomfort. ***Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol.*** 1992; 73(5): 570-4.
36. Furuya Y, Akimoto S, Yasuda K, Ito H. Apoptosis of androgen-independent prostate cell line induced by inhibition of fatty acid synthesis. ***Anticancer Res.*** 1997; 17(6D): 4589-93.
37. Gabrielson EW, Pinn ML, Testa JR, Kuhajda FP. Increased fatty acid synthase is a therapeutic target in mesothelioma. ***Clin Cancer Res.*** 2001; 7(1): 153-7.
38. Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. ***J Clin Oncol.*** 2002; 20(13): 3001-15.
39. George FW, Wilson JD. Sex determination and differentiation. In: Knobil E, Neill JD. ***The Physiology of Reproduction.*** Raven Press Ltd: New York, 1994 Cap 1 *apud* Brinkmann AO. Molecular basis of androgen insensitivity. ***Molecular and Cell Endocrinol.*** 2001; 179(1-2): 105-9.
40. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. ***Int J Cancer.*** 1983; 31(3): 13-20.
41. Gerdes J, Lemke H, Baish H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. ***J Immunol.*** 1984; 133(4):1710-15.

42. Goldblatt J, Singer SL. Autosomal recessive gingival fibromatosis with distinctive facies. ***Clin Genet***. 1992; 42(6): 306-8.
43. Gorlin RJ, Cohen MM, Levin LS. ***Syndromes of the head and neck***. 3. ed. New York: Oxford University Press; 1990. p. 847-58.
44. Graner E, Tsang D, Rossi S, Baron A, Migita T, Weinstein J, *et al*. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. ***Cancer Cell***. 2004; *in press*.
45. Gross SD. Case of hypertrophy of the gums. ***Louisville Review***. 1856; 1232 *apud* Jorgenson RJ, Cocker ME. Variation in the inheritance and expression of gingival fibromatosis. ***J Periodontol***. 1974; 45(7): 472-7.
46. Günhan O, Gardner DG, Bostanci H, Günhan M. Familial gingival fibromatosis with unusual histologic findings. ***J Periodontol***. 1995; 66(11): 1008-11.
47. Hannun YA, Obeid LM. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. ***J Biol Chem***. 2002; 277(29): 25847-50.
48. Hart TC, Pallos D, Bowden DW, Bolyard J, Pettenati MJ. Genetic linkage of hereditary gingival fibromatosis to chromosome 2p21. ***Am J Hum Genet***. 1998; 62(4): 876-83.
49. Hart TC, Pallos D, Bozzo L, Almeida OP, Marazita ML, O`Connell JR, Cortelli JR. Evidence of genetic heterogeneity for hereditary gingival fibromatosis. ***J Dent Res***. 2000; 79(10): 1758-64.

50. Hart TC, Zhang Y, Gorry MC, Hart PS, Cooper M, Marazita ML, *et al.* A mutation in the *SOS1* gene causes hereditary gingival fibromatosis type 1. ***Am J Hum Genet.*** 2002; 70(4): 943-54.
51. Hassell TM, Stanek EJ. Evidence that healthy human gingiva contains functionally heterogeneous fibroblast subpopulations. ***Archs Oral Biol.*** 1983; 28(7): 617-25.
52. Heemers H, Vanderhoydone F, Roskams T, Shechter I, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Androgens stimulate coordinated lipogenic gene expression in normal target tissues in vivo. ***Mol Cell Endocrinol.*** 2003; 205(10): 21-31.
53. Hirawat S, Budman DR, Kreis W. The androgen receptor: structure, mutations, and antiandrogens. ***Cancer Invest.*** 2003; 21(3): 400-17.
54. Hsu DKW, Donohue PJ, Alberts GF, Winkles JA. Fibroblast growth factor-1 induces phosphofructokinase, fatty acid synthase and Ca<sup>2+</sup>-ATPase mRNA expression in NIH 3T3 cells. ***Biochim Biophys Res Comm.*** 1993; 197(3): 1483-91.
55. Hsu MH, Chirala SS, Wakil SJ. Human fatty acid synthase gene: Evidence for the presence of two promoters and their functional interaction. ***J Biol Chem.*** 1996; 271(23): 13584-92.
56. Innocenzi D, Alò PL, Balzani A, Sebastiani V, Sillipo V, La Torre G, *et al.* Fatty acid synthase expression in melanoma. ***J Cutan Pathol.*** 2003; 30(1): 23-8.

57. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JCF, *et al.* The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. **Science**. 1999; 283(5398): 83-7.
58. Jensen V, Ladekari M, Holm-Nielsen P, Melsen F, Soerensen FB. The prognostic value of oncogenic antigen 519 (AO-519) expression and proliferative activity detected by antibody MIB-1 in node-negative breast cancer. **J Pathol**. 1995; 176(4): 343-52.
59. Johnson BD, El-Guindy M, Ammons WF, Narayanan AS, Page RC. A defect in fibroblasts from an unidentifie syndrome with gingival hyperplasia as the predominant feature. **J Periodontol Res**. 1986; 21(4): 403-13.
60. Jorgenson RJ, Cocker ME. Variation in the inheritance and expression of gingival fibromatosis. **J Periodontol**. 1974; 45(7): 472-7.
61. Kalkhoven E, Kwakkenbos-Isbrucker L, de Laat SW, **et al.** Synthetic progestins induce proliferation of breast tumor cell lines via the progesterone or estrogen receptor. **Mol Cell Endocrinol**. 1994; 102(1-2): 45-52.
62. Kawano H, Sato T, Yamada T, Matsumoto T, Sekine K, Watanabe T, *et al.* Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2003; 100(16): 9416-21.
63. Kelman Z, Hurwitz J. Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning machanism? **TIBS**. 1998; 23(7): 236-8.
64. Kharbanda OP, Sidhu SS, Panda SK, Deshmukh R. Gingival fibromatosis: Study of three generations with consanguinity. **Quintessence Int**. 1993; 24(3): 161-4.

65. Kill IR. Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillirin-deficient region of the dense fibrillar component. **J Cell Science**. 1996; 109(Pt 6): 1253-63.
66. Kleinrok Z, Sieklucka-Dziuba M, Zakladu Farmakologii AM. Androgens and brain. **Ginekol Pol**. 1994; 65(1): 45-50.
67. Kratz CL, Morin CK. Hereditary gingival fibromatosis: a child affected with concurrent abnormalities. **The Journal of Periodontics**. 1987; 11(2): 187-92.
68. Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE, Grizzle WE. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. **Head Neck**. 1999; 21(4): 325-9.
69. Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD **et al**. Fatty acid synthase: a potential selective target for antineoplastic therapy. **PNAS**. 1994; 91(14): 6379-83.
70. Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. **Nutrition**. 2000; 16(3): 202-8.
71. Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. **PNAS**. 2000; 97(7): 3450-4.
72. Kumar MV, Shimokawa T, Nagy TR, Lane MD. Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. **PNAS**. 2002; 99(4): 1921-5.

73. Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Ethier SP, Chinnaiyan AM. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthase. **Cancer Res.** 2003; 63(1): 132-9.
74. Li JN, Mahmoud MA, Han WF, Ripple M, Pizer ES. Sterol regulatory element-binding protein-1 participates in the regulation of fatty acid synthase expression in colorectal neoplasia. **Exp Cell Res.** 2000; 261(1): 1559-65.
75. Li JN, Gorospe M, Cherst FJ, Kumaravel TS, Evans MK, Han WH, Pizer ES. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. **Cancer Res.** 2001; 61(4): 1493-9.
76. Lin DI, Waltregny D, Graner E, Signoretti S, Garraway LA, Loda M. Androgen-dependent regulation of Her-2/neu (c-ErbB2) in prostate cancer cells. Trabalho em fase de elaboração.
77. Liu SC, Klein-Szanto AJP. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. **Oral Oncol.** 2000; 36: 145-51.
78. Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, Kuhajda FP. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. **Science.** 2000; 288(5475): 2379-81.
79. Lopez F, Belloc F, Lacombe F, Dumain P, Reiffers J, Bernard P, Boisseau MR. The labeling of proliferating cells by Ki-67 and MIB-1 antibodies depends on the binding of a nuclear protein to the DNA. **Exp Cell Res.** 1994; 210(2): 145-53.
80. Lu Z, Gu Y, Rooney SA. Transcriptional regulation of the lung fatty acid synthase gene by glucocorticoid, thyroid hormone and transforming growth factor- $\beta$ 1. **Biochim Biophys Acta.** 2001; 1532(3): 213-22.

81. Macluskey M, Ogden GR, Green M, Chisholm DM, Schor SL, Schor AM. The association between epithelial proliferation and disease progression in the oral mucosa. **Oral Oncol.** 1999; 35(4): 409-14.
82. Matsumoto H, Noji I, Akimoto Y, Fujii A. Comparative study of calcium-channel blockers on cell proliferation, DNA and collagen synthesis, and EGF receptors of cultured gingival fibroblasts derived from human nifedipine, nicardipine and nisoldipine responders. **J Oral Sci.** 2001; 43(4):261-8.
83. Meickle MC, Heath JK, Reynolds JJ. Advances in understanding cell interactions in tissue resorption. Relevance the pathogenesis of periodontal disease and a new hypothesis. **Oral Pathol.** 1986; 15: 239-49.
84. Mejia C, Navarro S, Pellin A, Ruiz A, Castel V, Llombart-Bosch A. Prognostic significance of cell proliferation in human neuroblastoma: comparison with other prognostic factors. **Oncol Rep.** 2003; 10(1): 243-7.
85. Myers RB, Oelschlager DK, Weiss HL, Frost AR, Grizzle WE. Fatty acid synthase: an early molecular marker of progression of prostatic adenocarcinoma to androgen independence. **The J Urol.** 2001; 165(3): 1027-32.
86. Milgraum LZ, Witters, LA, Pasternack, GR; Kuhajda FP. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in *in situ* breast carcinoma. **Clin Cancer Res.** 1997; 3(11): 570-5.
87. Modeer T, Andersson G. Regulation of epidermal growth factor receptor metabolism in gingival fibroblasts by phenytoin in vitro. **J Oral Pathol Med.** 1990; 19(4): 188-91.

88. Modeer T, Mendez C, Dahllof G, Anduren I, Andersson G. **J Periodontal Res.** 1990; 25(2): 120-7.
89. Nemoto T, Terashima S, Kogure M, Hoshino Y, Kusakabe T, Suzuki T, Gotoh M. Overexpression of fatty acid synthase in oesophageal squamous cell dysplasia and carcinoma. **Pathobiology.** 2001; 69(6): 297-303.
90. O-Charoenrat P, Rhys-Evans P, Modjtahedi H, Eccles SA. The role of c-*erbB* receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.** 2002; 38(7): 627-40.
91. Ojanotko-Harri A, Forsell H, Laine M, Hurttia H, Blauer M, Tuohimaa P. Immunohistochemical detection of androgen receptors in human oral mucosa. **Archs Oral Biol.** 1992; 37(6): 511-4.
92. Parkar M, Newman H, Olsen I. Polymerase chain reaction analysis of oestrogen and androgen receptor expression in human gingival and periodontal tissue. **Archs Oral Biol.** 1996; 41(10): 979-83.
93. Phipps RP, Borrello MA, Blieden TM. Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. **J Periodontol Res.** 1997; 32(1 Pt 2): 159-65.
94. Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, Heimburger DC, Grizzle WE. The expression of fatty acid synthase (FAS) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. **Hum Pathol.** 2000; 31(9): 1068-73.
95. Pizer ES, Wood FD, Pasternack GR. Fatty acid synthase (FAS): a target for cytotoxic antimetabolites in HL-60 promyelocytic leukemia cells. **Cancer Res.** 1996a; 56(4): 745-51.

96. Pizer ES, Jackisch C, Wood FD, Pasternack GR, Davidson NE, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. **Cancer Res.** 1996b; 56(12): 2745-7.
97. Pizer ES, Wood FD, Heine HS, Romantsev FE, Pasternack GR, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. **Cancer Res.** 1996c; 56(6): 1189-93.
98. Pizer ES, Kurman RJ, Pastrnack GR, Kuhajda FP. Expression of fatty acid synthase is closely linked to proliferation and decidualization in cycling endometrium. **Int J Gynecol Pathol.** 1997; 16(1): 45-51.
99. Pizer E, Lax S, Kuhajda F. Fatty acid synthase expression in endometrial carcinoma: correlation with cell proliferation and hormone receptors. **Cancer.** 1998a; 83(3): 528-37.
100. Pizer ES, Chrest FJ, Diguseppe JA, Han WF. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. **Cancer Res.** 1998b; 58(20): 4611-5.
101. Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, Frehywot GL, Townsend CA, Kuhajda FP. Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. **Cancer Res.** 2000; 60(2): 213-8.
102. Pizer ES, Pflug BR, Bova GS, Han WF, Udan MS; Nelson JB. Increased fatty acid synthase as a therapeutic target in androgen-independent prostate cancer progression. **Prostate.** 2001; 47(2): 102-10.

103. Ramer M, Marrone J, Stahl B, Burakoff R. Hereditary gingival fibromatosis: identification, treatment, control. **JADA**. 1996; 127(4): 493-5.
104. Ramon Y, Berman W, Bubis JJ. Gingival fibromatosis combined with cherubism. **Oral Surg, Oral Medic, Oral Pathol**. 1967; 24(4): 435-48.
105. Rashid A, Pizer ES, Moga M, Milgraum LZ, Zahurak M, Pasternack GR, *et al*. Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. **Am J Pathol**. 1997; 150(1): 201-8.
106. Redman RS, Ward CC, Patterson RH. Focus of epithelial dysplasia arising in hereditary gingival fibromatosis. **J Periodontol**. 1985; 56(3): 158-62.
107. Rossi S, Graner E, Febbo P, Weinstein L, Bhattacharya N, Onody T, *et al*. Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. **Mol Cancer Res**. 2003; 1(10): 707-15.
108. Sanchez AT, Chapado MS, Sanchez AR, Martinez JP, Codes FB, Ramos PR, Galvis OL. **Arch Esp Urol**. 2002; 55(3): 257-65.
109. Sandra F, Mitsuyasu T, Nakamura N, Shiratsuchi Y, Ohishi M. Immunohistochemical evaluation of PCNA and Ki-67 in ameloblastoma. **Oral Oncol**. 2001; 37(2): 193-8.
110. Semczuk A, Skomra D, Cybulski M, Jakowicki JA. Immunohistochemical analysis of MIB-1 proliferative activity in human endometrial cancer. Correlation with clinicopathological parameters, patient outcome, retinoblastoma immunoreactivity and K-ras codon 12 point mutations. **Histochem J**. 2001; 33(4): 193-200.

111. Sekiguchi M, Shiroko Y, Arai T, Kishino T, Sugawara I, Kusakabe T, *et al.* Biological characteristics and chemosensitivity profile of four human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. ***Biomed Pharmacother.*** 2001; 55(8): 466-74.
112. Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. ***J Cell Biol.*** 1993; 123(3): 513-22.
113. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. ***J Cell Physiol.*** 2000; 182(3): 311-22.
114. Shirasuna K, Okura M, Watatani K, Hayashido Y, Saka M, Matsuya T. Abnormal cellular property of fibroblasts from congenital gingival fibromatosis. ***J Oral Pathol.*** 1988; 17(8): 381-5.
115. Signoretti S, Montironi R, Manola J, Altimari A, Tam C, Bubley G, *et al.* Her-2-neu expression and progression toward androgen independence in human prostate cancer. ***J Natl Cancer Inst.*** 2000; 92(23): 1918-25.
116. Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, Lopes MA, Kowalski LP, Graner E. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. ***Oral Oncology.*** 2004; *in press.*
117. Singer SL., Goldblatt J, Hallam LA, Winters JC. Hereditary gingival fibromatosis with a recessive mode of inheritance. Case reports. ***Australian Dent J.*** 1993; 38(6): 427-32.

118. Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehulsing M, Eckel HE. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. **Oral Oncol.** 1999; 35(6): 583-9.
119. Slade RF, Hunt DA, Pochet MM, Venema VJ, Hennigar RA. Characterization and inhibition of fatty acid synthase in pediatric tumor cell lines. **Anticancer Res.** 2003; 23(2B): 1235-43.
120. Smith S. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. **FASEB.** 1994; 8(15): 1248-59.
121. Soory M, Gower DB. Investigation of androgen metabolism by hyperplastic tissue fibroblasts in relation to phenytoin. **Med Sci Res.** 1990; 18: 835-7.
122. Starborg M, Gell K, Brundell E, Hoog C. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. **J Cell Science.** 1996; 109(Pt 1): 143-53.
123. Swinnen JV, Esquenet M, Goossens K, Heyns W, Verhoeven G. Androgens stimulate fatty acid synthase in the human prostate cancer cell line LNCaP. **Cancer Res.** 1997a; 57(6): 1086-90.
124. Swinnen JV, Ulrix W, Heyns W, Verhoeven G. Coordinate regulation of lipogenic gene expression by androgens: Evidence for a cascade mechanism involving sterol regulatory element binding proteins. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1997b; 94(24): 12975-80.
125. Swinnen JV, Heemers H, Deboel L, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G. Stimulation of tumor-associated fatty acid synthase expression by growth factor

activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway. **Oncogene**. 2000; 19(45): 5173-81.

126. Swinnen JV, Veldhoven PPV, Timmermans L, De Schrijver E, Brusselmans K, Vanderhoydonc F, *et al.* Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. **Bioch Biophys Res Comm**. 2003; 302(4): 898-903.

127. Takahiro T, Shinichi K, Toshimitsu S. Expression of fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. **Clin Cancer Res**. 2003; 9(6): 2204-12.

128. Teruel T, Valverde AM, Benito M, Lorenzo M. Transforming growth factor  $\beta$ 1 induces differentiation-specific gene expression in fetal rat brown adipocytes. **FEBS**. 1995; 364(2): 193-7.

129. Tipton DA, Howell KJ, Dabbous MK. Increased proliferation, collagen, and fibronectin production by hereditary gingival fibromatosis fibroblasts. **J Periodontol**. 1997; 68(6): 524-30.

130. Tobey RA, Valdez JG, Crissman HA. Synchronization of human diploid fibroblasts at multiple stages of the cell cycle. **Experim Cell Res**. 1988; 179(2): 400-16.

131. Traish AM, Kim N, Min K, Munarriz R, Goldstein I. Role of androgens in female genital sexual arousal: receptor expression, structure, and function. **Fertility and Sterility**. 2002; 77: S11-17.

132. Tsurimoto T. PCNA, a multifunctional ring on DNA. **Bioch Biophys Acta**. 1998; 1443(1-2): 23-39.

133. Vittek J, Rappaport SC, Gordon GG, Munnangi PR, Southren AL. Concentration of circulating hormones and metabolism of androgens by human gingiva. **J Periodontol.** 1979; 50(5): 254-64.
134. Xiao S, Wang X, Qu B, Yang M, Liu G, Bu L, *et al.* Refinement of the locus for autosomal dominant hereditary gingival fibromatosis (GINGF) to a 3.8-cM region on 2p21. **Genomics.** 2000; 68(3): 247-52.
135. Xiao S, Bu L, Zheng G, Yang M, Qian M, Hu L, *et al.* A new locus for hereditary gingival fibromatosis (GINGF2) maps to 5q13-q22. **Genomics.** 2001; 74(2): 180-5.
136. Xie X, De Angelis P, Clausen OPF, Boysen M. Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas. **Oral Oncol.** 1999; 35(5): 502-9.
137. Xiong S, Chiraia SS, Wakil SJ. Sterol regulation of human fatty acid synthase promoter I requires nuclear factor-Y- and Sp-1-binding sites. **PNAS.** 2003; 97(8): 3948-53.
138. Yang YA, Han WF, Morin PJ, Chrest FJ, Pizer ES. Activation of fatty acid synthesis during neoplastic transformation: role of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. **Exp Cell Res.** 2002; 279(1): 80-90.
139. Yang Y, Morin PJ, Han WF, Chen T, Bornman DM, Gabrielson EW, Pizer ES. Regulation of fatty acid synthase expression in breast cancer by sterol regulatory element binding protein-1c. **Exp Cell Res.** 2003; 282( ): 132-7.

140. Zhou W, Simpson PJ, McFadden JM, Townsend CA, Medghalchi SM, Vadlamudi A, *et al.* Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells. ***Cancer Res.*** 2003; 63(21):7330-7.
141. Wakil SJ. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. ***Biochemistry.*** 1989; 28(11): 4523-30.
142. Wang X, Song, K, Guo Q, Tian W. The galloyl of green tea catechins is the critical structural feature to inhibit fatty-acid synthase. ***Biochem Pharmacol.*** 2003; 66(10): 2039-47.
143. Wilhelm SM, Javed T, Miller RL. Human gingival fibroblast collagenase: Purification and properties of precursors and active forms. ***Coll Rel Res.*** 1984; 4(2): 129-52.