



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

RODRIGO SOARES DE ANDRADE

**ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA EM REDES DE INTERAÇÕES
FUNCIONAIS E METABÓLICAS DE PACIENTES COM
FIBROMATOSE GENGIVAL HEREDITÁRIA.**

Piracicaba

2017

RODRIGO SOARES DE ANDRADE

**ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA EM REDES DE INTERAÇÕES
FUNCIONAIS E METABÓLICAS DE PACIENTES COM
FIBROMATOSE GENGIVAL HEREDITÁRIA.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Estomatopatologia, na Área de Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Hercílio Martelli Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno Rodrigo Soares de Andrade e orientada pelo Prof. Dr. Hercílio Martelli Júnior.

Piracicaba

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 152571/2015-9
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6114-0929>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

An24a Andrade, Rodrigo Soares de, 1992-
Análise de bioinformática em redes de interações funcionais e metabólicas de pacientes com fibromatose gengival hereditária / Rodrigo Soares de Andrade. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Hercílio Martelli Júnior.
Coorientador: Ricardo Della Coletta.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Fibromatose gengival. I. Martelli Júnior, Hercílio. II. Della Coletta, Ricardo, 1972-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Analysis on bioinformatic in functional and methabolic interations channels in patients with hereditary gingival fibromatosis

Palavras-chave em inglês:

Fibromatosis, gingival

Área de concentração: Estomatologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Hercílio Martelli Júnior [Orientador]

Allan Roger dos Santos Silva

Janete Dias Almeida

Data de defesa: 24-07-2017

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 24 de Julho de 2017, considerou o candidato RODRIGO SOARES DE ANDRADE aprovado.

PROF. DR. HERCÍLIO MARTELLI JÚNIOR

PROF^a. DR^a. JANETE DIAS ALMEIDA

PROF. DR. ALAN ROGER DOS SANTOS SILVA

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais **Moacir** e **Lúcia** e a minha irmã **Nayara** por sempre acreditarem e torcerem por mim e por não medirem esforços pra investir na minha formação.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Hercílio Martelli Júnior** pela admirável dedicação, pelo entusiasmo e por ser o grande estimulador desta pesquisa. Por ter o dom de atrair seus alunos a também se encantarem com este mundo com sua simplicidade e humildade.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, por todo ensinamento e auxílio, por sua prontidão e disposição em ensinar e esclarecer minhas dúvidas (que foram inúmeras), por ser grande influenciador do meu interesse nesse intrigante campo da Biologia Celular e Molecular. Aos senhores, toda minha admiração e respeito.

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba** da Universidade Estadual de Campinas, através da figura do seu diretor, **Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques**, pelo acolhimento e oportunidades cedidas;

À Coordenadoria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba na pessoa da **Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury** e ao Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia em nome do coordenador **Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes**;

Ao **CnPq** pela concessão da bolsa de mestrado no período Agosto de 2015 à Julho de 2017;

Aos **Profs. Drs. Alan Roger dos Santos Silva, Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Oslei Paes de Almeida, Pablo Agustin Vargas e Ricardo Della Coletta**, pelo admirável conhecimento e dedicação ao ensino e pesquisa;

Especialmente agradeço ao **Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva**, pela admirável forma com que vive para a ciência. Pela honra de me deixar fazer parte do Orocentro, maior centro de referência em estomatologia do país, me possibilitando exercer minha maior paixão e realização profissional que é estar na clínica. Por todos os dias entrar no Orocentro com uma energia admirável, pelos estimuladores conselhos, pelo apoio e preocupação com cada aluno e pelos muitos ensinamentos que compartilhou comigo ao longo deste período, sempre demonstrando que o faz pelo simples fato de amar sua profissão;

Às colegas de Orocentro **Mariana e Juliana**, por todo conhecimento, amizade e discussão, aprendo muito todos os dias com vocês;

Ao **Dr. Rogério Elias e Dra. Elisabete** por todo ensinamento e paciência no Orocentro;

As funcionárias **Dani e Dona Cida**, que sem duvidas, deixam o ambiente de trabalho muito mais prazeroso com sua presença e profissionalismo;

Aos colegas de laboratório **Ana Camila, Carol, Fernanda, Maurício, Florence, Rebeca, e Andrea** pelos conhecimentos compartilhados e momentos de descontração;

Ao colega **Renato** por toda colaboração;

As pós Doutorandas **Débora e Carine** por todo ensinamento e orientação, vocês sem duvidas foram de grande importância na minha formação;

Aos colegas do Programa de Pós Graduação **Amanda, Anna Luiza, Celeste, Cíntia, Débora, Diego, Isabel, Jéssica, Leonardo, Marisol, Patrícia, Pedro, Priscila, Renata, Thayná, Vinícius e Wagner** e aos outros que já concluíram sua passagem pelo programa pelo companheirismo, momentos divertidos e por compartilhar as alegrias e medos;

Aos meus amigos **Gleyson, Danielle, Jéssica** e posteriormente **Bruno**, por estarem comigo desde o começo, em todos os momentos. Fui e sou muito feliz de ter vocês comigo;

Aos meus novos amigos **Iara, Ana e Luan**, que chegaram na minha vida e a mudaram completamente, enchendo-a ainda mais de alegria, amizade e felicidade. Agradeço imensamente a Deus todos os dias por ter conhecido vocês. Vocês são demais!

A **Natália**, que merece não só uma sessão separada nos meus agradecimentos, mas na minha vida! Desde o início você foi meu alicerce em todos os momentos. Com certeza sem você essa jornada teria sido muito mais difícil. Te admiro muito e te desejo todo sucesso do mundo, você é um daqueles anjos que cai na nossa vida, espero te ter sempre ao meu lado;

Ao **Felipe** que além de um grande amigo é um companheiro incrível, que me ensina todos os dias com seus valores sólidos. Você é um homem admirável, me espelho em você, para evoluir como pessoa;

Aos técnicos do laboratório, **Fabiana e Fábio** pelos conhecimentos e colaboração;

Aos **funcionários da FOP** por cada sorriso em todas as manhãs;

A Dra. **Luciana Mofato**, pelo auxílio e ensinamentos em bioinformática, onde não mediu esforços em me ensinar uma nova modalidade de análise, e para que eu me sentisse a vontade em seu departamento na Genômica e Proteômica da UNICAMP.

A Prof. Dra. **Sabina Pego** por toda colaboração, auxílio e prontidão para me ajudar em todas as etapas da minha dissertação, sem dúvidas todo o sucesso desse trabalho é também mérito da senhora, sou eternamente grato;

Ao Prof. Dr. **Gilberto Borges**, por ter me apresentado à pesquisa, me dando oportunidades onde não mais havia, por sempre incentivar, confiar e investir em mim;

A Prof. Dra. **Sanivia Pereira**, por sempre acreditar no meu potencial e me motivar para vida acadêmica, com certeza se cheguei até aqui foi pelo incentivo e fé da senhora em mim;

A **Universidade de Uberaba**, e a todos meus professores da graduação, em especial os da Clínica integrada, por me ensinarem com muita destreza a amar a odontologia.

Por último e mais importante a **Deus e todas as manifestações de seu infinito amor**, por me mostrar em todos os momentos de fraqueza que ele estava do meu lado, cuidando de mim;

EPÍGRAFE

“Deus escreve certo por linhas tortas.”

Autor Desconhecido.

RESUMO

Fibromatose gengival hereditária (FGH) é uma condição genética incomum, que tem como característica um lento e progressivo crescimento fibroso, não hemorrágico e indolor dos tecidos gengivais, devido ao aumento da deposição de colágeno e outras macromoléculas na matriz extracelular. O primeiro caso foi descrito por Gross em 1.856 e a prevalência foi estimada em 1:750.000 nativos. A FGH é transmitida como traço autossômico dominante, porém herança recessiva também é relatada. Essa condição manifesta-se como fenótipo isolado, mas pode apresentar-se com menor frequência associadas a formas sindrômicas. O tratamento desta condição varia de acordo com a extensão clínica, mas geralmente se dá através de gengivectomia/gengivoplastia e efetivo controle de placa bacteriana. O presente estudo fez uma análise em testes de exomas a partir do DNA isolado de amostras de sangue de 4 famílias distintas com FGH, compostas no total de 12 pacientes, sendo 10 afetados e 2 não afetados. As análises foram realizadas através de abordagens detalhadas de bioinformática, focando em redes de interações funcionais e metabólicas com mutações em cada grupo familiar, cada qual com sua singularidade. Foram encontradas 64 redes de interação funcionais e metabólicas, sendo eleitas 16 por suas correlações fisiopatológicas com a FGH. Na família A, dentro das 16 redes, foram encontrados 10 genes mutados com relação direta com a FGH. Na família B e C foram encontrados 8 genes mutados e na família D, foram encontrados 7 genes mutados. Os genes encontrados mantêm uma relação direta com a fisiopatologia da FGH, sendo que apenas o *WDR66*, gene encontrado em *GINGF3*, *locus* já descrito na literatura. Os resultados sugerem um padrão de heterogeneidade no aspecto de herança e mutação em cada família afetada pela FGH, as mutações encontradas participam de vias comuns de síntese de colágeno, evidenciando que eventos associados, de modos diferente em cada grupo familiar, são capazes de expressar o fenótipo da FGH.

Palavras chave: Fibromatose gengival hereditária, exoma, mutação genética.

ABSTRACT

Hereditary gingival fibromatosis (HGF) is an uncommon genetic condition, characterized by slow and progressive fibrous, non-hemorrhagic and painless growth of the gingival tissues due to the increased deposition of collagen and other macromolecules in the extracellular matrix. The first case was described by Gross in 1856 and the prevalence was estimated in 1: 750,000 live births. HGF is transmitted as an autosomal dominant trait, but recessive inheritance is also reported. This condition manifests itself as an isolated phenotype and in rare cases can be a component of several syndromes. The treatment of HGF varies according to the severity in which the condition is presented, and usually the gingivectomy/gingivoplasty is the mainly used modality. The present work performed an analysis of exomas from DNA extracted from blood samples from 4 distinct families, composed of a total of 12 patients, 9 affected and 3 unaffected. The analysis was performed under detailed bioinformatics approaches, focusing on functional and metabolic interaction channels related to the mutations in each family group, regarding its singularity. Sixty-six functional and metabolic interaction channels were found in which 16 were chosen for their pathophysiological correlations with HGF. Family A presented 10 mutated genes with direct relation to HGF, within the 16 interaction channels. Families B and C presented 8 mutated genes, and in family D, 7 mutated genes were found. Regarding all the genes, only the *WDR66* gene was found in *GINGF3*, a locus already described in the literature. The association of the mutated genes and the deregulation of their functions, even if distinct in each family, sum up events that, in association, may be the cause of the phenotypic expression of HGF. The results also support the theory that associated events, in different ways in each family group, is able to express HGF.

Keywords: Hereditary gingival fibromatosis, exoma, genetic mutation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C - Crianças

°C - Graus Celsius

GC - “Grand childrens” – Crianças grandes

DNA - Ácido desoxirribonucléico

FGH - Fibromatose gingival hereditária

HCL- Ácido clorídrico

INDEL - Inserção e deleção

INF γ - Interferon

IL - Interleucinas

Min - Minutos

MIP - Sonda de inversão molecular

ml - Mililitros

MEC - Matriz extracelular

MMP - Metaloproteinase de matriz

Ng - Nanograma

PCR - Reação de polymerase em cadeia

Pb - Pares de base

P4Hs - Prolil-4 - hidroxidase

RE - Reticulo endoplasmático

RNA - Ácido ribonucleico

RBC - “Ryses buffer cell”

SOS1 - “Son of Sevenless”

SBP - Amostra de purificação de “beads”

SMB - “Streptavidin magnetic beads”

SNP - “Single nucleotid polymorphisms”

TGF- β 1 - Fator de crescimento transformante

TIMP- Inibidor de metaloproteinase de matriz tecidual

TEM - Transição epitélio/mesenquima

VCF - “Variant Caller Forma”

VEP - “Variant Effector Predictor”

Xg - Força centrífuga

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
3 PROPOSIÇÃO	25
3.1 Proposição geral	25
3.2 Proposições específicas	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	26
4.2 Seleção dos pacientes e coleta de sangue	26
4.3 Isolamento de DNA a partir das amostras de sangue	27
4.4 Exomas	28
4.5 Bioinformática	30
4.5.1 Abordagens iniciais	31
5 RESULTADOS	39
5.1 Resultados clínicos	39
5.2 Resultados histológicos	40
5.3 Resultados das análises das redes de interações funcionais e metabólicas por grupo familiar	40
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética	

1 INTRODUÇÃO

Fibromatose gengival hereditária (FGH) (OMIM #135300) é uma condição genética incomum, caracterizada por um lento e progressivo crescimento fibroso, indolor e não hemorrágico da gengiva, devido ao aumento da deposição de colágeno e outras macromoléculas na matriz extracelular (Babu et al., 2011; Lai et al., 2011). O primeiro caso de FGH foi descrito por Gross em 1.856 e a prevalência foi estimada em 1:750. 000 nativos (Fletcher, 1966; Livada et al., 2013).

O crescimento gengival envolve a porção marginal e inserida da gengiva, com coloração geralmente rósea-pálida, superfície corrugada e consistência firme que pode recobrir parcial ou totalmente a coroa clínica do dente (Baer et al., 1974) e que não apresenta tendência a regressão espontânea (Tripathi et al., 2015). Os efeitos mais comuns provocados pelo aumento gengival são diastemas, mau posicionamento dos dentes, retenção prolongada de dentição decídua, atraso na erupção dos dentes permanentes, mordidas abertas e cruzadas, lábios proeminentes, podendo variar a severidade entre famílias diferentes e em membros da mesma família. Problemas periodontais, como sangramento e perda óssea, podem ocorrer devido ao excesso de tecido gengival, presença de pseudo-bolsas e acúmulo de biofilme (Goldblatt et al., 1992; Bittencourt et al., 2000; Clorcher et al., 2003).

A FGH é transmitida como traço autossômico dominante, porém a herança recessiva também foi descrita (Bozzo et al., 1994). A fibromatose gengival pode manifestar-se como fenótipo isolado ou apresentar-se mais raramente como componente de várias síndromes como, síndrome de Cowden (hamartomas múltiplos), síndrome de Zimmerman-Laband (defeitos de formação óssea, ouvido, nariz e esplenomegalia), síndrome de Rutherford (distrofia corneana) (Abhinav et al., 2011). Em casos isolados, sem associação sindrômica, as alterações mais comumente observadas são hipertricose, deficiência mental e epilepsia (Synder 1965; Livada et al., 2013).

Bittencourt et al. (2000) mostram que aproximadamente 80% de todos os casos relatados são familiares e os 20% remanescentes são ou esporádicos ou apresentam heredogramas inadequados. O heredograma e a história familiar são fundamentais para a análise do modo de transmissão.

Miller et al (1993) sugerem que os dentes têm uma importante influência no desenvolvimento do quadro clínico da FGH. A erupção ativa, o metabolismo, além de outros fatores do meio, determina o potencial genético a iniciar a anormalidade clínica. Entretanto, a forma localizada é mais comum na maioria das famílias, a forma generalizada da doença por seu aparecimento em idade tardia, tem induzido alguns autores a tratá-las como entidades separadas. A forma localizada ou focal é de diagnóstico mais tardio, por volta da terceira década, enquanto a forma generalizada pode ser detectada na dentição mista. Talvez essa diferença cronológica na manifestação das formas de FGH contribua para a discordância diagnóstica. Também, a expressividade do gene é variável, encontrando-se, dentro de uma mesma família, indivíduos com vários graus de severidade (Babu et al., 2011).

Evidências experimentais demonstram que o aumento gengival observado em pacientes com FGH pode estar associado com uma elevada capacidade proliferativa de fibroblastos residentes, um aumento na síntese de colágeno ou uma redução nos níveis de expressão, produção e secreção de metaloproteinases (MMPs) (Coletta et al., 1999; Andrade et al., 2001).

Quando se observa microscopicamente a FGH, nota-se que o epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado se encontra hiperplásico, projetando longas, delgadas e profundas cristas epiteliais para o tecido conjuntivo subjacente que possui feixes de fibras colágenas densas, numerosas e permeados por fibroblastos, vasos sanguíneos e ocasionalmente infiltrado inflamatório discreto (Kanagotagi et al., 2015).

Embora transmitida geneticamente, os eventos moleculares que levam ao crescimento tecidual gengival na FGH ainda não são totalmente conhecidos. A localização gênica das mutações precursoras da condição apresenta evidências de heterogeneidade (Zandinejad et al., 2015). Coletta et al (2006) mostraram em culturas de células que em níveis basais ou condicionais com fator de crescimento transformante (TGF- β 1), os fibroblastos derivados da FGH proliferam mais rapidamente que fibroblastos de gengiva normal e produzem menor quantidade de metaloproteinases de matriz, particularmente MMP-1 e MMP-2 que se encontram associadas à degradação de moléculas colagênicas.

Por influência genética, ocorre um espessamento do tecido gengival, de aspecto liso nodular, principalmente na época de troca da dentição decídua (Colan et al., 1988). A fibrose decorrente promove uma verdadeira barreira mecânica causando problemas funcionais e estéticos (Bittencourt et al., 2000).

Poucos trabalhos que fizeram uma análise através de exomas, em grupos distintos afetados por FGH de modo independente. Na literatura encontram-se trabalhos mostrando diferentes mutações e em loci diversos em casos de fibromatose gengival hereditária. Como o exoma é uma técnica que identifica todos os éxons (regiões codificadoras, o que poderia ter impacto funcional na produção de certas proteínas), seria possível localizar a etiologia da doença, auxiliando ainda mais na compreensão desta alteração genética. A partir desse momento poderia se mensurar o acometimento dessa condição e poder avaliar a transmissão da mutação em um núcleo familiar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A fibromatose gengival, clinicamente, pode ser resultante de vários fatores tais como a inflamação, desequilíbrio hormonal, neoplasias, alterações adversas de medicamentos como fenitoina, nifedipina, cefalosporinas e ciclosporinas (mas o alargamento não se estende para além da junção mucogengival) e algumas causas idiopáticas (Coletta et al., 2006). A fibromatose gengival também pode ser oriunda de fatores hereditários, sendo chamada de fibromatose gengival hereditária, que é uma condição caracterizada pelo aumento gengival difuso, cobrindo grandes partes da gengiva ou a mesma em sua totalidade (Babu et al., 2011). A FGH é relatada em associação com anomalias dentárias, destacando-se a amelogenese imperfeita hipoplásica (Martelli-Júnior et al., 2008).

A FGH apresenta-se clinicamente firme, de inserção fibrosa que cobre os rebordos alveolares e estende-se sobre os dentes, resultando em pseudo-bolsas extensas. A cor pode ser normal ou eritematosa se inflamada (Collan et al., 1982). O tecido gengival pode tornar-se tão firme e fibroso que se assemelha a um tecido calcificado na palpação (Tipton et al., 1997).

A FGH pode cobrir a parte coronal de um dente até sua superfície oclusal. Este crescimento excessivo também pode se estender ao palato, o que altera seu contorno. Como efeito resultante pode-se incluir a dificuldade de fala e mastigação dolorosa quando o alimento desvia para o tecido fibromatoso. Em casos graves, a vista clínica da a mandíbula pode se assemelhar com “bulbos” (Brown et al., 1995).

O espessamento gengival pode chegar a impedir o selamento dos lábios produzindo protrusão dos mesmos e em casos mais severos (quando se estende para o palato) pode causar deformação, levando a compressão da língua e criando dificuldades na fonação e mastigação. Pode também ocasionar diastemas, mau posicionamento e retenção prolongada dos dentes decíduos causando problemas estéticos e funcionais. Constatou-se a retenção de alguns dentes decíduos, com auxílio de radiografia panorâmica. A raça caucasiana é a mais afetada (Martelli Júnior et al., 2008). A manifestação da FGH dá se pelo acúmulo excessivo de proteínas na matriz extracelular (MEC), incluindo o colágeno tipo I (Bonnaure-Mallet et al., 1995). Porém, os mecanismos moleculares e bioquímicos que desencadeiam esse processo não são completamente compreendidos.

Collan et al. (1982) observaram a presença de dois tipos de fibroblastos no tecido afetado: um tipo mais arredondado, cercado por substância fundamental com pouco colágeno, e outro tipo de fibroblasto aparentemente inativo e cercado por áreas ricas em colágeno. A ocorrência simultânea de FGH com a erupção dental sugere que possa haver uma seleção particular de células ou a ativação de certos clones de fibroblastos por trauma físico ou produtos de células mononucleadas. Dessa forma parece que os fibroblastos da FGH podem ser ativados fenotipicamente durante o desenvolvimento dental.

Existe uma controvérsia quanto à quantidade de colágeno produzida pelos fibroblastos isolados de pacientes com FGH. Tripton et al. (1997) mostraram que fibroblastos oriundos da FGH cresceriam mais lentamente ou na mesma velocidade que o crescimento de fibroblastos oriundos de gengiva normal. Porém um estudo mais recente de Coletta et al. (2006) observaram que os fibroblastos da FGH têm uma velocidade aumentada de proliferação. Os fibroblastos produzem até duas vezes mais colágeno do tipo I do que fibroblastos normais, o que contribuiria para o aumento gengival. Em contraste, Farrer-Brown et al. (2001) relataram que os fibroblastos associados à FGH sintetizariam cerca de 50% da quantidade de colágeno quando comparados com fibroblastos normais. Estas discrepâncias parecem estar relacionadas à falta de compreensão da expressão fenotípica heterogênea do fibroblasto.

Durante a biossíntese de colágeno, os únicos polipeptídios de pró colágeno nascentes passam por modificação pós-translacional no retículo endoplasmático (RE), formam cadeias helicoidais triplas e são secretados para o espaço extracelular. Este processo envolve a proteína de choque térmico 47 (Hsp47), uma glicoproteína de 47 kDa localizada no RE. Ele se liga aos peptídeos de pró-colágeno nascentes do tipo I para prevenir a dobra prematura e a agregação das cadeias de pró colágeno e participa da translocação e secreção do pró colágeno I para o espaço extracelular (Satoh et al., 1996).

O colágeno de tipo I e os níveis de RNAm e proteína Hsp47 aumentam significativamente em culturas de fibroblastos derivadas de pacientes com FGH (Martelli-Júnior et al., 2003). Além disso, o fator de crescimento transformante (TGF)- β 1 e a interleucina (IL) -6 induzem a expressão de colágeno de tipo I e Hsp47 e regulam negativamente a metaloproteinase de matriz (MMP) -1 e MMP-2 em culturas de fibroblastos de doentes com FGH. Em contraste, o interferon- γ (IFN- γ) reduziu a expressão de colágeno I e Hsp47 e afeta ligeiramente a expressão de MMP-1 e MMP-2 (Martelli-Júnior et al., 2003). Esta observação sugere que Hsp47 pode ser uma molécula crucial no

processamento pós-translacional das cadeias de pró-colágeno de tipo I sobre produzidas, enquanto a produção aumentada de TGF- β 1 e IL-6 em pacientes com FGH pode favorecer o acúmulo de fibras de colágeno na gengiva.

As prolil-4-hidroxilases (P4Hs) são igualmente enzimas essenciais na biossíntese e dobramento de cadeias polipeptídicas de colágeno recém-sintetizadas em moléculas triplo helicoidais. P4Hs são tetrâmeros α 2 β 2 consistindo de uma das três isoformas da subunidade α [α (I), α (II) ou α (III)] que têm atividade catalítica similar (Kukkola et al., 2003). A expressão da subunidade α de P4Hs limita a taxa de formação de P4H ativa e síntese de colágeno (Han et al., 1999). O aumento dos níveis de atividade de P4H é relatado em um número de condições fibróticas, como queloides e fibrose hepática (Abergel et al., 1985). Alguns estudos relataram aumento da expressão e atividade de prolil hidroxilases em FGH (Meng et al., 2007). Notavelmente, Meng et al (2007) identificaram a isoforma I da subunidade α de P4H α como a isoforma associada, enquanto que as formas tipo II e III de P4H não foram afetadas. Estes achados sugerem que P4H α (I) pode estar envolvido na patogênese de HGF e confirmar que os fibroblastos em FGH são desregulados ao nível da modificação da proteína pós-traducional.

Alterações na expressão de MMPs, enzimas chave que regulam a composição da MEC, têm sido implicadas na patogênese de FGH. Vários estudos mostram uma diminuição significativa na expressão e atividade de MMP-1 e MMP-2 em fibroblastos de doentes com FGH em comparação com os controles (Coletta et al., 1999). A MMP-1 é uma collagenase que degrada o colágeno intersticial, enquanto que a MMP-2 atua predominantemente no colágeno tipo IV, mas também demonstrou degradar o colágeno tipo I em sua forma nativa (Aimes et al., 1995). De forma semelhante, a inibição de MMP-1, MMP-2 e MMP-3 tem sido relatada em GO induzida por CsA, uma condição também associada com uma produção aumentada de TGF- β 1 (Shin et al., 1998). A atividade catalítica das MMPs é regulada ao nível da transcrição bem como por inibidores de metaloproteinase de matriz de tecido (TIMPs). Curiosamente, a adição de anticorpos anti-TGF- β 1 no estudo de Coletta et al (1999) resultou em um ligeiro aumento na MMP-1 e uma diminuição na expressão de MMP-2, enquanto a expressão de TIMP-1 e TIMP-2 não foi afetada. Estes resultados confirmam observações anteriores de que a produção aumentada de TGF- β 1 pode conduzir à acumulação de MEC alterando as atividades proteolíticas dos fibroblastos.

O desenvolvimento de eventos fibróticos pode envolver o processo conhecido como transição epitelial/mesenquimal (TEM), esse ocorre fisiologicamente durante o desenvolvimento

de órgãos e tecidos. Neste processo, a destruição parcial da membrana basal pode levar a uma difusão inadequada de fatores entre o tecido conjuntivo e as camadas epiteliais dos tecidos gengivais. Estes fatores podem estimular as células epiteliais a perderem os contatos célula-célula, diminuir a expressão da E-caderina e aumentar a motilidade celular, promovendo sua invasão no estroma do tecido conjuntivo subjacente, onde se diferenciam mais em células que são indistinguíveis dos fibroblastos e miofibroblastos. Estas células fibroblásticas, por sua vez, produzem proteínas do tecido conjuntivo que contribuem para a fibrose (Coletta et al., 2006).

A FGH é caracterizada por um tecido conjuntivo rico em feixes densos de fibras colágenas, que são orientadas aleatoriamente e permeadas por fibroblastos (Coletta et al., 1999). Pêgo et al. (2016) confirmaram esse padrão no nível ultra estrutural. As fibrilas de colágeno predominaram entre outros componentes fibrilares da MEC e foram caracterizadas por um padrão de bandagem D-periódico claro. Eles foram devidamente embalados e dispostos em feixes organizados em várias direções, como é normalmente observado no tecido conjuntivo não modificado. Esta disposição ultra estrutural foi observada nas amostras de tecido normal e de FGH analisadas. As mesmas características também foram descritas na mucosa normal (Chavrier et al., 1984) e na fibromatose gengival idiopática. Entretanto, o estudo *in vitro* de Meng et al. (2008) não confirmaram a presença de fibrilas de colágeno maduras em torno das células fibroblásticas.

Barros et al. (2001) sugeriram que a FGH deveria ser incluído no grupo de doenças colagênicas hereditárias porque as fibrilas de colágeno estão dispostas irregularmente e exibem laços e dissociações em forma de corda. Outros trabalhos encontraram aspecto ultra estrutural semelhante em uma família afetada com FGH (Pêgo et al., 2015). Tanto o tecido afetado pela FGH quanto de tecido gengival normal apresenta fibrilas de colágeno formando dobras, o que sugere que estes aspectos não são únicos para a FGH. Além disso, essas características são identificadas em áreas onde a organização de feixes de colágeno é perdida.

As fibrilas de colágeno curtas, curvas e orientadas aleatoriamente são normalmente encontradas em áreas onde há grandes quantidades de colágeno tipo III, uma característica do tecido normal associada à sua capacidade de remodelação (Chavrier et al., 1984). Na cicatrização, o colágeno tipo III é observado principalmente nos estádios iniciais, refletindo seu papel na remodelação de tecidos (Chavrier et al., 1984; Couble, 1999).

Amostras de tecido gengival com FGH e tecidos gengivais normais exibem vários tipos de células, incluindo mastócitos, macrófagos, células plasmáticas e fibroblastos. Os fibroblastos

apresentaram organelas bem preservadas e cisternas aumentadas no retículo endoplasmático rugoso, indicando a presença de síntese proteica ativa. Mitocôndrias com cristas mitocondriais bem preservadas também foram encontradas. Foram relatados na literatura que na mucosa normal e na fibromatose gengival idiopática diversos fibroblastos com retículo endoplasmático aumentado, associados a um grande número de grânulos secretores, aparelhos de Golgi e numerosas mitocôndrias (Sakamoto et al.; 2002). Em estudos de co-cultura, fibroblastos derivados da FGH mostraram as mesmas características ultraestruturais, que estão relacionadas à sua capacidade de sintetizar a maioria dos componentes da MEC (Meng et al., 2012).

O ácido hialurônico foi descrito como um elemento estrutural da MEC e é composto por células estreladas que formam uma rede (Hermanns-Lê, Piérard, 2007). No estudo de Pêgo et al. (2016), uma fina rede envolvendo estruturas circulares similares às descritas anteriormente foi encontrada nas amostras de FGH.

Feixes filamentosos foram encontrados, na FGH, em um arranjo paralelo, localizado nos espaços interfibrilar de fibrilas de colágeno e em torno de fibroblastos. Esses filamentos fazem parte do sistema elástico e tendem a se acumular em áreas onde o tecido conjuntivo é submetido a tensão e estresse. Embora não haja nenhuma explicação relevante, é possível sugerir que pode haver mais tensão no tecido gengival derivado da FGH, em comparação com o tecido gengival normal, e que pode estimular os fibroblastos a sintetizar uma grande quantidade destas fibras na MEC (Khan et al., 2012).

A FGH pode ser diagnosticada por sua característica gengival peculiar (com ou sem envolvimento de síndrome associada) e história familiar positiva. Tendo em vista que o diagnóstico da FGH pode ser exclusivamente clínico, as características histopatológicas podem ser úteis na conclusão quando o diagnóstico clínico for nebuloso. (Livada et al., 2013; Khan et al., 2012).

As características histopatológicas clássicas da FGH são do tecido conjuntivo altamente fibroso, com feixes de colágeno densas dispostas, inúmeros fibroblastos fusiformes e tecido conjuntivo que é relativamente avascular. Tecido gengival acantótico e epitélio escamoso estratificado hiperqueratótico que também está presente com cristas epiteliais alongadas. Camadas superficiais do epitélio podem, ocasionalmente, apresentar características de inflamação como o edema (Khan et al., 2012; Livada et al., 2013). Pequenas calcificações ósseas e abundantes feixes neurovasculares também podem estar presentes. O excesso de tecido gengival pode proporcionar

novos nichos para o crescimento de microrganismos, acúmulo de placas e formação de pseudo bolsas, resultando em infiltração inflamatória do tecido conjuntivo gengival (Livada et al., 2013).

Partículas calcificadas, ilhas de metaplasia óssea, ulceração da mucosa sobrejacente e inflamação podem ser ocasionalmente observadas em torno de tecido conjuntivo (Farrer-Brown et al., 2001). A organização das fibras de colágeno no tecido conjuntivo pode ser observada a partir de lesões da FGH, fibrilas espaçadas com esboços irregulares, às vezes em *loops*, intercalados em volta de fibrilas normais. Isto foi atribuído ao aumento do número de substâncias de matriz e filamentos em uma rede ramificada. Também observa-se que as fibras oxitalânicas eram comuns, mas o número de fibras elásticas foi diminuído (Barros et al., 2001).

Alterações semelhantes degenerativas de fibras elásticas, juntamente com o aumento de fibras finas, intercaladas entre fibrilas de colágeno defeituoso foram comumente relatados em doenças em que contêm estreitas relações entre alterações patogênicas das fibras elásticas e fibras de colágeno (Duncan et al., 1987).

Quando se analisa o DNA de famílias acometidas com FGH, confirma-se a herança autossômica dominante dessa condição, embora haja casos recessivos ou mesmo como autossômicas hereditárias ligadas ao X também foram relatados (Singer et al., 1993). A análise de sequência na região 2p21-p22 subjacente ao *locus GINGF* mostrou uma inserção de uma única base no gene *Son-de-Sevenless -1 (SOS-1)* (MIM #182530) numa extensa família brasileira caracterizada por uma herança dominante de FGH. Mais notavelmente, a inserção de uma única citosina resultando em uma proteína truncada foi identificada em todos os membros da família afetados por FGH, enquanto não foi encontrada em membros da família não afetados ou no grupo controle (Hart et al., 2002). Portanto, uma mutação em *SOS-1* foi proposta como um possível fator etiológico para FGH não síndrômico, e definida como tipo 1 (Singer et al., 1993).

A alteração que geralmente resulta na FGH acontece através de um fator de permuta de um nucleotídeo de guanina, que atua na transdução de sinais que controlam o crescimento e diferenciação celular. Os cromossomos números 2, 4 e 5 são encontrados com seus loci gênicos específicos, incluindo 2p21-p22 (*GINGF*), 2p13-p16, 2p22. 3-23 (*GINGF3*), 5q13-q22 (*GINGF2*), 4q21, e 4t, que estão em associação com a FGH, permitindo mutações, deleções, duplicações, e outras anomalias genéticas. Outros loci gênicos como 8, 14q, 19p, 19q, e Xq também estão relacionados a diversas síndromes associadas com a FGH (Ma et al., 2014).

O mecanismo preciso da FGH é desconhecido, mas pode ser relacionada ao aumento da proliferação dos fibroblastos na gengiva (Coletta et al., 2006) aumentando assim consideravelmente a síntese de colágeno nos tecidos gengivais (Jayachandran et al., 2013). O desenvolvimento simultâneo da FGH com a erupção dos dentes sugere que uma seleção particular de célula ou a ativação de determinados clones de fibroblastos por trauma físico ou produtos de células mononucleares que podem participar da FGH (Khan et al., 2012).

O tratamento da FGH é cirúrgico, embora exista controvérsia a respeito da época da intervenção e em relação à conduta a ser tomada quanto aos dentes envolvidos. O acompanhamento é necessário, pois a recorrência é frequente, principalmente quando dentes são mantidos na cavidade bucal. Um programa rigoroso de higiene bucal deve ser instituído. Associação de extração seletiva de dentes nos casos graves pode ser necessária para obter-se uma morfologia tecidual normal da gengiva e serve para controlar o crescimento gengival, pois, segundo os autores, o mecanismo de crescimento gengival cessaria na ausência dos dentes, por uma razão ainda não identificada (Charvier et al., 1987).

A necessidade de tratamento da FGH varia de acordo com a gravidade. O aumento relativo na quantidade de tecido gengival faz a necessidade de uma intervenção cirúrgica devido ao compromisso funcional e estética. O tratamento consiste em excisão cirúrgica do tecido alterado; muitas vezes em uma série de gengivectomias, que deve ser acompanhada por um programa efetivo de higiene bucal. Estudos como o de Miller et al., (1993) têm documentado o uso do laser de dióxido de carbono na realização da gengivectomia, no entanto, o método mais utilizado de remoção de grandes quantidades de tecido é a gengivectomia com bisel externo convencional com gengivoplastia, particularmente quando há pseudo bolsas e sem perda de inserção (Shafer et al., 1983; Baptista, 2002). Um procedimento com retalho periodontal pode ser preferido a FGH quando acompanhada com perda de inserção e defeitos ósseos. (Bansal et al., 2002). A recidiva é imprevisível para cada paciente e independe da técnica cirúrgica utilizada e de fatores locais. O efeito da higiene oral é essencial no prognóstico da fibromatose e contribui para a recorrência do aumento gengival (James et al., 2007).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 PROPOSIÇÃO GERAL

- Avaliar a associação de mutações em éxons na etiologia da fibromatose gengival hereditária, em núcleos familiares brasileiros.

3.2 PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS

- Estimar e quantificar as mutações em pacientes com fibromatose gengival hereditária quando comparados a pacientes não afetados.
- Verificar a transmissão da mutação no núcleo familiar com fibromatose gengival hereditária.
- Analisar se há mutações comuns entre grupos familiares distintos que possam ser causadores da fibromatose gengival hereditária.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Todos os experimentos deste estudo foram realizados de acordo com as normas relativas à ética em pesquisa envolvendo seres humanos, após deliberação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP – processo 001/2012, anexo 1), e seguindo a Resolução 196/06 relativas às pesquisas em seres humanos no Brasil.

4.2 Seleção de pacientes e coleta das amostras de sangue

A seleção dos pacientes foi realizada na Clínica de Estomatologia do Curso de Odontologia da Universidade Estadual de Montes Claros - UNIMONTES, Montes Claros, Minas Gerais. Foram selecionados 12 pacientes de 4 grupos familiares distintos afetados com FGH previamente diagnosticados, com idades entre 12 e 60 anos e sem distinção de sexo, sendo 10 afetados e 2 não afetados. Foram analisadas as características clínicas e histopatológicas apenas dos pacientes afetados. Todos os pacientes foram submetidos à coleta de sangue, para posterior isolamento de DNA. Foram coletados 10 mL de sangue venoso periférico de cada paciente em um laboratório de análises clínicas (Laboratório Raphá – Montes Claros, MG), cumprindo todas as regras de biossegurança. O laboratório funciona em estrita conformação com as Diretrizes do Conselho Federal de Farmácia e com as condições de biossegurança adequadas de acordo com os organismos competentes de acompanhamento e fiscalização. Os 4 grupos familiares foram divididos em famílias A, B, C e D para melhor organização e compreensão no estudo.

Logo após a coleta das amostras foram adicionados 1 mL de Dextrosol a cada 4 mL de sangue. Essa substância a base de glicose, tem como função fixação das células sanguíneas, impedindo a hemólise durante o transporte e consequentemente extravasamento de proteínas como hemossiderina no meio, mantendo assim a integridade do DNA. Depois de realizadas as coletas, o sangue foi armazenado a 4°C e transportado até Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), Piracicaba-São Paulo, onde foi realizado o isolamento do DNA de cada integrante.

4.3 Isolamento de DNA a partir de amostra de sangue

Para o isolamento das amostras foi utilizado o kit illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit da GE Healthcare e o protocolo especificado da empresa. O sangue foi transferido para um tubo falcon de 15 mL, em uma proporção 1 de amostra para 4 de RBC buffer (Buffer). Após homogeneização por 5 min., os tubos foram centrifugados a 3000 rpm, durante 5 min., em temperatura ambiente. O sobrenadante (plasma) foi descartado e o precipitado (pellet) transferido para um tubo eppendorf de 2mL, onde foram adicionados 20µl de proteinase k, para degradação de proteínas sanguíneas e 400 µl de Lysis Buffer Type 10 para lise das células. A mistura após ser incubada por 10 min. em temperatura ambiente e sendo agitada regularmente, foi transferida para a coluna sílica do kit e centrifugada (Centrifuge 5430/5430 R - Eppendorf) por 1 min. a 11000 x g.

Após descarte do sobrenadante, foi adicionado mais 500 µl de Lysis buffer type 10 na coluna de sílica e centrifugado (Centrifuge 5430/5430 R - Eppendorf) por 1 min. a 11000 x g e descartado o eluente em seguida. Foi adicionado 500 µl de Wash buffer type 6 na coluna, centrifugado por 3 min. a 11000 x g e descartado o eluente. A coluna de sílica foi transferida para um tubo eppendorf de 2 mL DNAase e RNAase-free e adicionado 200µl de Ellution Buffer pré-aquecido a 70°C. Após incubado por 1 min. em temperatura ambiente, foi centrifugado por 1 min. a 11000 x g e o eluente foi armazenado. A concentração e pureza das amostras foram determinadas por espectrofotometria com uma razão 260/280 nm (espectrofotômetro NanoDrop® 2000 - Thermocientific). Onde valores inferiores a 1,7 indica contaminação com proteína e valor superior a 2 indica contaminação com RNA.

4.4 Exoma

Após o isolamento do DNA, ocorreu uma sequência de preparos no laboratório com o objetivo de separar e enriquecer os exons. Em seguida, essa amostra representativa do exoma foi processada em sequenciadores. O sequenciamento fez a leitura da sequência de DNA de todo o exoma e produziu arquivos de dados, que foram processados por programas de bioinformática especializada e posteriormente analisados. A análise foi uma associação de vários testes como PCR (reação em cadeia de polimerase), MIP (sonda de inversão molecular), captura híbrida, captura na solução, e sequenciamento. As análises dos exomas foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Para realização dos exomas o DNA foi mantido intacto com uma razão 260/280 de 1,8-2. Examinou-se a qualidade do DNA através de eletroforese em gel de agarose a 1%. Foi utilizado o kit FC-140-1001 Nextera® Rapid Capture Exome Kit (2 rxn x 12 >> plex) para realização dos exomas. Para iniciar os experimentos o gDNA foi preparado, quantificado e normalizado da seguinte maneira:

- Foi quantificado gDNA utilizando um método fluorométrico, com o Qubit.
- Foi normalizado o gDNA em Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 10 ng / µl.
- Foi requantificado o gDNA normalizado utilizando o mesmo método de quantificação fluorométrica.
- Após diluído o gDNA e normalizado em Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 para um volume final de 10 µl a 5 ng /µl (50 ng total).

Para separação do exons foi utilizado um sistema de purificações por meio de nano esferas magnéticas, de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante. A purificação dos exons foi realizada em 4 etapas e dentre cada uma dela ocorrendo uma etapa de limpeza. Na etapa de limpeza através de buffers de lavagem os reagentes são retirados, assim o gDNA foi incubado a 50 °C por um tempo médio de 21 horas. A etapa da limpeza usa SPB (Amostra Purificação Beads) para purificar o DNA, marcando a partir do Nextera transposome. A etapa de limpeza remove principalmente o Nextera transposome que caso contrário, liga-se às extremidades do DNA e interfere nos processos subsequentes. Nessa etapa o gDNA foi purificado obtendo apenas os exons.

A amplificação do DNA marcado acontece após sua purificação, então foram adicionados adaptadores de índice, utilizando um processo com 10 ciclos de PCR. Esta etapa de PCR adicionou-se os adaptadores de índice 1 (i7), Adaptadores de Índice 2 (i5) e adaptadores de sequenciamento necessários para amplificação de cluster. Na hibridização foi combinado em bibliotecas de DNA contendo índices exclusivos em um único *pool* que em seguida, ligaram-se regiões alvo do DNA com sondas de captura. Na captura das regiões hibridizadas foi utilizado SMB (Streptavidin Magnetic Beads) para capturar sondas hibridizadas para as regiões alvo de interesse. Duas lavagens aquecidas removeram a ligação não específica das pérolas.

A biblioteca enriquecida foi então eluída a partir das pérolas de metal e preparada para uma segunda ronda de hibridização. Na segunda hibridização foi ligado as regiões alvo do DNA enriquecido com sondas de captura pela segunda vez. Esta segunda hibridização assegura alta especificidade das regiões capturadas. Foi utilizado SMB (Streptavidin Magnetic Beads) para capturar sondas hibridizadas para as regiões alvo de interesse. Duas lavagens aquecidas removeram a ligação não específica das pérolas. A biblioteca enriquecida foi então eluída a partir das pérolas e preparada para sequenciamento. Na etapa de sequenciamento, foi realizada a montagem digital do mapeamento dos exons que foram amplificados durante o processo laboratorial. Esse mapeamento foi montado a partir das leituras realizadas no pool com todas as bibliotecas (Illumina, Inc., San Diego, CA, EUA) e montado um arquivo de 50Gb em média. O arquivo de fluxo foi então carregado no sistema de sequenciamento HISEQ 2000 (Illumina), e o sequenciamento foi realizado com 2 9 101 pb de comprimento de leitura.

4.5 Bioinformática

Esta análise teve o intuito de verificar por bioinformática se há alterações nos exomas sequenciados, comparando-os com um genoma de referência. Para isso, foram inicialmente realizados os mapeamentos das sequências das amostras (presentes nos arquivos FASTQ) contra o genoma humano (GRCh38.p7) através do programa BWA (Burrows-Wheeler Aligner) (Li & Durbin, 2009).

Posteriormente, foi usado o programa PICARD [<http://broadinstitute.github.io/picard>] para converter os dados gerados pelo alinhamento (de SAM para BAM) e também para filtrar duplicatas. Depois de formatados, os dados foram submetidos ao programa GATK (“Genome Analysis Toolkit”) (McKenna et al., 2010), usado para realizar buscas de polimorfismos, que envolvem SNP’s (“Single nucleotide polymorphisms”) e Indel’s (inserções e deleções). O software GATK possui ferramentas que detectam erros de sequenciamento pelo método Bayesiano (McKenna et al., 2010).

A partir dos arquivos de saída gerados pelo GATK (VCF – “Variant Caller Format”), foram obtidas as frequências de cada SNP / Indel’s em cada gene relacionado ao genoma de referência. Após isso, os dados foram submetidos ao programa VEP (“Variant Effector Predictor”) (McLaren et al., 2010) para terem cada alteração anotada. Através do VEP, todas as variantes foram comparadas com dados de SNPs/InDels frequentes na população detectados por 1000 Genomes Project Consortium (2015) e por International HapMap Consortium (2003), além de determinar quais variantes possuem potencial deletério (pelo SIFT) e patogênico (pelo PolyPhen).

Sequencialmente foram utilizadas algumas estratégias para análises de bioinformática. Foi pensado em buscar algum gene mutado comum entre todos os afetados seguindo três abordagens distintas. Em um primeiro momento tentou-se usar as abordagens a seguir.

4.5.1 Abordagens iniciais

Abordagem 1

- Mapeou primeiro SNPs / Indels comuns entre as 10 amostras de pacientes afetados (A).
- Excluiu todos os SNPs / Indels comuns entre a amostra 11 (A – amostra 11 = B)
- Excluiu todos os SNPs / Indels comuns entre a amostra 12 (B – amostra 12 = C)
- Analisou somente os resultados em C (Figura 1).

De acordo com essa análise obteve-se:

SNPs:

60 genes com SNPs

Não foram encontrados SNPs com efeito deletério (SIFT/Polyphen) e alto impacto.

Entre os dados da literatura, aparecem genes nos loci do GINGF3:

- *ATAD2B*: ATPase family, AAA domain containing 2B

(Chr2: 23887741-23887741), dentro de intron.

- *MUC6*: mucin 6, oligomeric mucusgel-forming

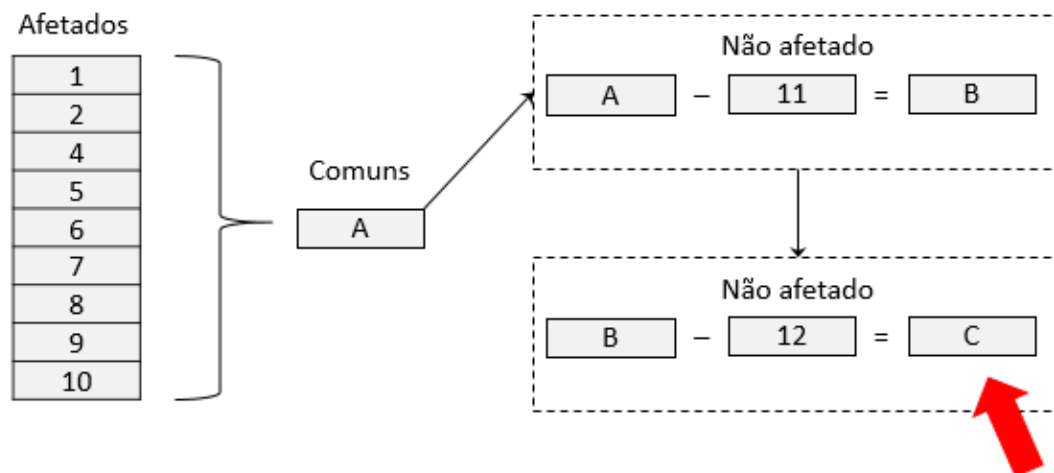
(Chr11: 1017858-1017858), mutação missense com troca de base (aTg/aCg) e troca de aminoácido (M/T); SIFT (tolerated (0.86)) e PolyPhen (unknown (0));

Indels:

10 genes com Indels

Não foram encontradas mutações de alto impacto ou genes localizados em *loci* causadores da FGH descritos pela literatura.

Figura 1 – Abordagem utilizada na análise 1



Abordagem 2

- Mapeou primeiro SNPs / Indels comuns entre as 10 amostras de pacientes afetados (A).
- Excluiu todos os SNPs / Indels comuns entre a amostra 11 ($A - \text{amostra 11} = B$)
- Excluiu todos os SN's / Indels comuns entre a amostra 12 ($A - \text{amostra 12} = C$)
- Analisou separadamente os resultados de B e C (Figura 2).

Com o resultado de B, obteve-se:

SNPs:

- 927 genes com SNPs.
- Entre os SNPs, 8 genes possuem efeitos deletérios (SIFT/Polyphen).
- Entre os dados da literatura:
 - 11 genes no chr2 (*GINGF3* e *GINGF4*);
 - 7 genes no chr5 (*GINGF2*);
 - 22 genes no chr11 (*GINGF3*).

Indels:

- 122 genes com Indels
- Entre os Indels, 4 genes possuem mutações de alto impacto.
- Entre os dados da literatura:
 - 1 genes no chr2 (*GINGF3*);
 - 7 genes no chr5 (*GINGF2*);

Com os resultados de C obteve-se:

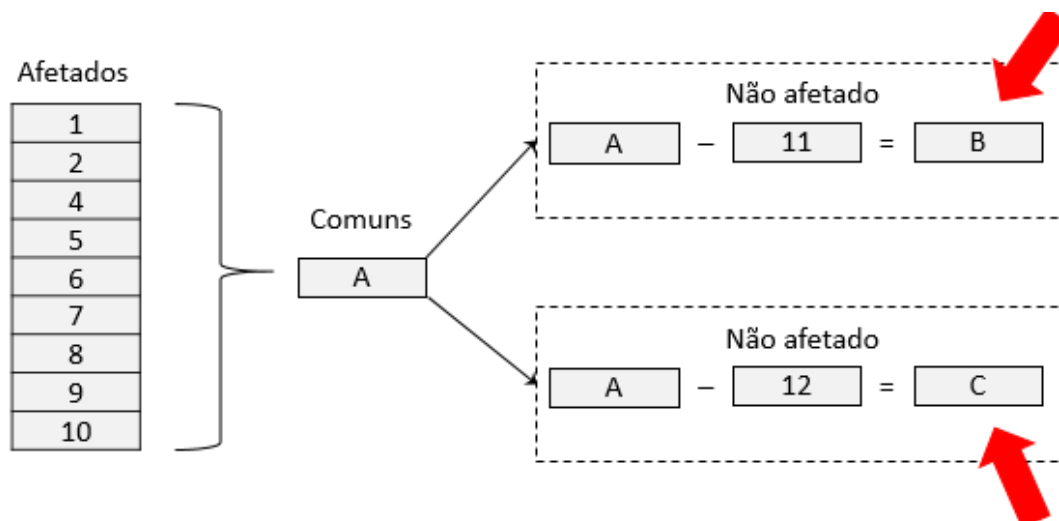
SNPs:

- 1047 genes com SNPs.
- Entre os SNPs, 7 genes possuem efeitos deletérios (SIFT/Polyphen).
- Entre os dados da literatura:
 - 15 genes no chr2 (*GINGF1*, *GINGF3* e *GINGF4*);
 - 10 genes no chr5 (*GINGF2*);
 - 27 genes no chr11 (*GINGF3*).

Indels:

- 127 genes com Indels.
- Entre os Indels, 3 genes possuem mutações de alto impacto.
- Entre os dados da literatura:
 - 4 genes no chr2 (*GINGF1*);
 - 1 genes no chr5 (*GINGF2*);
 - 2 genes no chr11 (*GINGF3*).

Figura 2 - Abordagem utilizada na análise 2.



Abordagem 3

- Mapeou primeiro SNPs / Indels comuns entre as 10 amostras de pacientes afetados (A).
- Excluiu todos os SNPs / Indels comuns entre a amostra 11 ($A - \text{amostra 11} = B$).
- Excluiu todos os SNPs / Indels comuns entre a amostra 12 ($A - \text{amostra 12} = C$).
- Selecionou os SNPs / Indels comuns entre B e C ($B \cap C$) (Figura 3).

Nos resultados da análise 3, obteve-se:

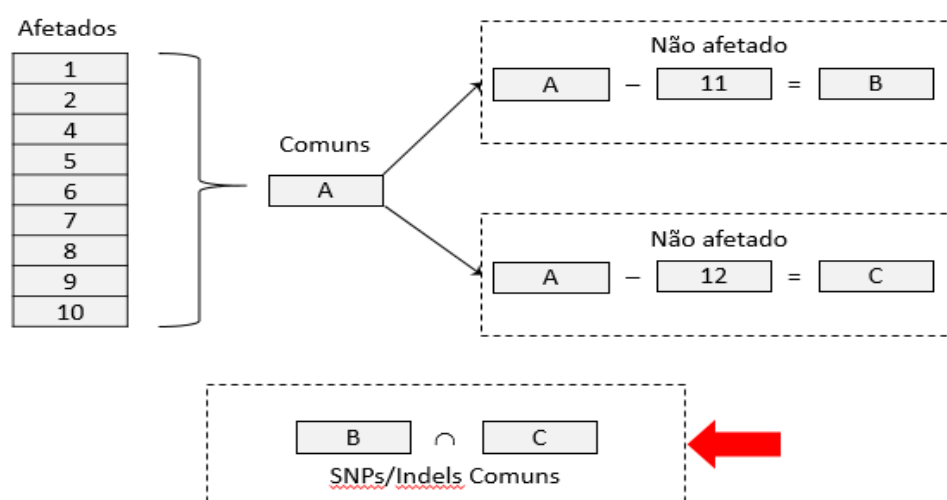
SNPs:

- 911 genes com SNPs
- Entre os SNPs, 8 genes possuem efeitos deletérios (SIFT/Polyphen).
- Entre os dados da literatura:
 - 14 genes no chr2 (*GINGF1*, *GINGF3* e *GINGF4*);
 - 10 genes no chr5 (*GINGF2*);
 - 27 genes no chr11 (*GINGF3*).

Indels:

- 117 genes com Indels.
- Entre os Indels, 3 genes possuem alto impacto.
- Entre os dados da literatura:
 - 4 genes no chr2 (*GINGF1* e *GINGF4*);
 - 1 genes no chr5 (*GINGF2*);
 - 2 genes no chr11 (*GINGF3*).

Figura 3 – Abordagem utilizada na análise 3



Com os resultados dessas análises, foi possível perceber que a heterogeneidade de resultados foi muito extensa. Além de terem sido usadas associação lélicas entre os afetados foi selecionado e filtrados os genes por alto impacto de mutação, capacidade de deleção, poder modificador e *probably demaging*. Então se obteve os seguintes genes:

Abordagem 1:

- SNPs:

CDK4 - regulador de quinase-ciclino dependente.

COL5A3 - colágeno tipo 5.

EDNRRB - receptor de proteína (tipo B) em endotélio.

KRT24 - Queratina 24.

- Indels:

COL11A1 - colágeno tipo 11.

MYOM2 - regulação de miosina tipo 2.

VCL – vinculina (proteína presente em membrana de citoesqueleto).

Abordagem 2

Resultado de B:

- SNPs

PTPRQ - proteína tirosina fosfatase (membrana celular).

MMP26 - matriz metalopeptidase.

- Indels - 4 possuem alto impacto.

FOLR3 - receptor de folato (absorção de ácido Fólico).

SLC16A7 - transportador de monocarboxilato lactato, com afinidade por piruvato.

ZNF778 - precursor de zinco - presente em micro modelação.

WDR41 -

- Outro Indel importante dessa análise

EPB41L4A - regulador de proteínas de transporte de membrana celular.

Resultado de C:

- 7 genes em SNPs com efeitos deletérios

RAD17 – Regulador de ciclo celular em G2 (podemos pensar na produção exacerbada de fibroblastos).

COLCA6 - colágeno tipo VI.

VPS54 - proteínas de vacúolos. Faz transportes a partir do complexo de Golgi.

VRK2 - atua em apoptose celular (checkpoint).

PRMT3 - enzimas catalizadoras e metilação de nitrogênio de resíduos orgânicos.

- Indels -3 genes com alto impacto.

GOLGA6L2 - atua em algumas desordens de sistema nervoso (presente em síndrome de angelman).

RBBP6 - proteína supressora de tumor de retinoblastoma.

KRT24 - queratina estrutural, atuando em actina, microfilamentos e microtubulos que compõe o citoesqueleto das células.

- Outros Indels

SOS1 E *SOS2* - IT (já bem descritos na literatura)

TMEM80 - proteína de transmembrana

Abordagem 3

- SNPs - 8 genes possuem efeitos deletérios

CCDC168

COL6A6 - colágeno tipo 6

CNTNAP3 – reconhecimento celular dentro do sistema nervoso (checkpoint)

FBXW8 – atua em ligações peptídicas PTN-PTN

MACC1 - metástase de câncer de colo

RAD17 - regulação de ciclo celular em G2 - via metabólica RAD-RAD9-HUS1(checkpoint)

RP1L1 – Pigmentação

- Outros SNPs

VPS54 - proteína de transporte através do complexo de Golgi

MRP536 – Proteína de atuação mitocondrial ribossômica

MUC6 - regulador de mucina

CDK7 - citoqueratina 7

- Indels - 3 genes com alto impacto

GOLGA6L2 - encontrado mutado em desordens neurais.

RBBP6 - proteína supressora de tumor de retinoblastoma (Checkpoint RB)

KRT24 – Queratina estrutural, atuando em microfilamentos e microtúbulos que compõe o citoesqueleto celular.

- Outros Indels

ZNF215 – precursor de zinco - micromodelação celular

Contudo, com esses resultados não se obteve nenhum dado significativo, quando pensamos em mutações específicas que contenham tropismo por tecidos gengivais. Os resultados obtidos foram genéricos e amplos, sem muita especificidade. Portanto, uma nova abordagem foi realizada onde, analisaram-se as redes de interações funcional e metabólicas afetadas, e a partir delas, selecionamos os genes afetados em cada uma, para posterior análise.

Através do programa ClueGo[®] foram analisados as redes de interações funcionais e metabólicas alteradas e os genes participantes de cada via. Redes de interações funcionais e metabólicas são encontradas em nosso genoma, na forma de vias de comunicação entre sistemas de formação. Essa foi uma maneira encontrada pelo nosso organismo para melhor usar os recursos biológicos disponíveis. Redes funcionais são estudadas em Sistêmica e são selecionadas através de processos evolutivos. Visto desta forma, estas redes são "recorrentes", ou seja, elas se repetem mesmo em sistemas geneticamente distantes (Alon, 2007).

A partir disso em cada grupo familiar foi adotado um padrão de transferência mutagênica distinta. Diante disso foi criada uma caracterização transcriptômica das vias metabólicas alteradas, onde foram selecionadas dezesseis vias que, quando verificadas no programa *Sciencebio*, observaram-se os genes mutados de acordo com sua atividade, sendo eleitos por sua função e expressão fenotípica causal. Esses genes foram filtrados por SIFT = “deleterious”/ “deleterious” e “low confidence”/ “PolyPhen = possibly” / “probably damaging” / “high impact”.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados Clínicos

Foram analisadas 4 famílias, sendo que as idades dos integrantes variaram entre 12 e 60 anos e em sua maioria eram mulheres (66%). Foram analisados 10 pacientes afetados e 2 não afetados. Clinicamente, observou-se certa diferença entre as expressões fenotípicas em cada integrante afetado, porém com características muito similares. Dentre os pacientes afetados foram analisados 2 com um grau de manifestação da FGH grave, 4 moderados e 3 com grau de manifestação leve

O crescimento do tecido gengival se mostrou de consistência fibrosa e por vezes endurecido. Com o aumento do tecido em alguns casos, a coroa clínica dos dentes ficaram parcialmente recobertas, criando pseudo-bolsas que facilitavam o acúmulo de placa bacteriana, porém sem a presença de inflamação propriamente dita.

Figura 4 - Imagem clínica de pacientes afetados por graus diferentes de FGH.

A – Grau leve. Imagem B – Grau moderado. Imagens C e D – Grau grave.

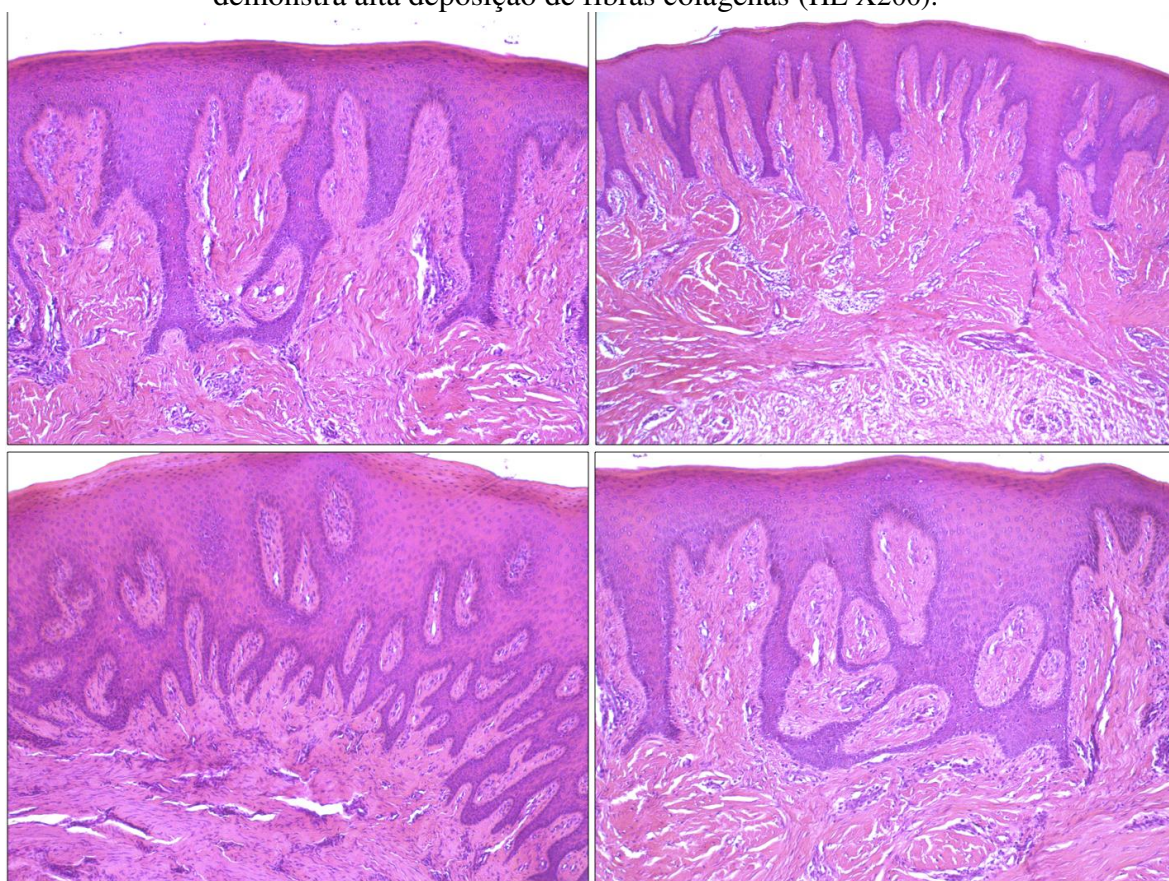
Imagem



5.2 Resultados Histológicos

Histologicamente, observou-se um epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado hiperplásico, projetando longas, delgadas e profundas cristas epiteliais para o tecido conjuntivo. Subjacente ao epitélio nota-se um tecido conjuntivo com alta deposição de fibras colágenas. Observaram-se feixes nervosos e numerosos vasos sanguíneos no tecido conjuntivo.

Figura 5 – Fotomicrografia do tecido gengival de paciente com fibromatose gengival hereditária mostrando um epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado com projeção de cristas epiteliais em direção à lâmina própria. O tecido conjuntivo subjacente demonstra alta deposição de fibras colágenas (HE X200).

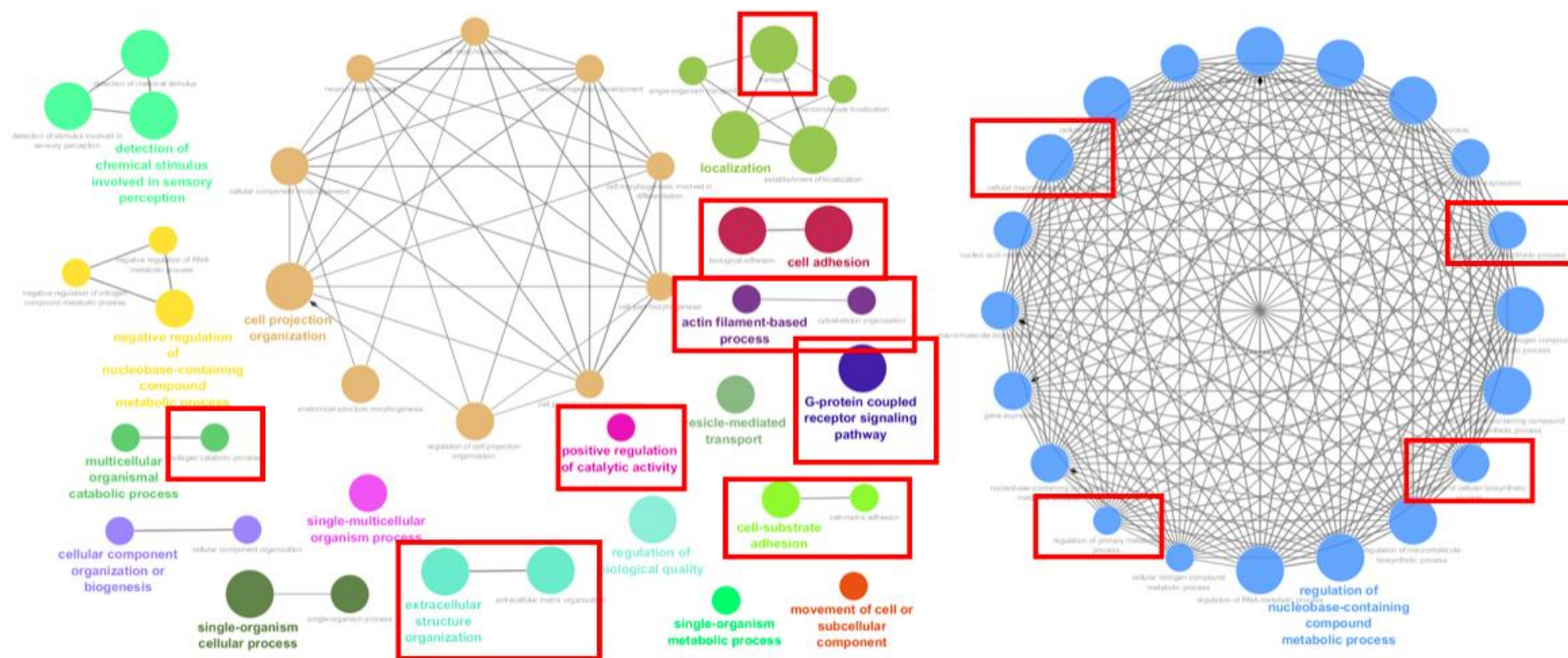


5.3 Resultados do exoma por análises de redes de interações funcionais e metabólicas por grupo familiar

Com os resultados da análise das redes de interações funcionais e metabólicas realizadas, chegou-se em um resultado de 64 redes alteradas. Dessas, foram escolhidas por questões biológicas e associação com as características da patogenicidade da doença, 16 redes (Tabela 2) (Figura 6) e dentre essas, observamos os genes mutados. Pela ampla heterogeneidade de resultados entre as famílias, foi assumido um padrão distinto de verificação entre cada uma delas, sendo que mantivemos as 16 redes alteradas em cada uma.

Tabela 1 – Redes de interações funcionais e metabólicas alteradas analisadas nos grupos familiares.

Nome da via
<i>G-protein coupled receptor signaling pathway</i>
<i>Positive regulation of catalytic activity</i>
<i>Biological adhesion</i>
<i>Cell adhesion</i>
<i>Cell-substrate adhesion</i>
<i>Cell-matrix adhesion</i>
<i>Extracellular structure organization</i>
<i>Extracellular matrix organization</i>
<i>Collagen catabolic process</i>
<i>Transport</i>
<i>Regulation of biosynthetic process</i>
<i>Regulation of primary metabolic process</i>
<i>Regulation of cellular biosynthetic process</i>
<i>Cellular macromolecule biosynthetic process</i>
<i>Actin filament-based process</i>
<i>Cytoskeleton organization</i>



Dentro dessas 16 redes, foi observado se algum dos lócus descritos na literatura está presente (*GINGF 1*, *GINGF 2* e *GINGF 3*) que estão localizados nos cromossomos 2, 5 e foram utilizados também filtros por alto impacto de mutação, capacidade de deleção, poder modificador *probably damaging*. A partir disso obtiveram-se os resultados por família.

Na família A se assumiu um padrão de herança autossômico recessivo (Figura 7), sendo que os pais seriam heterozigotos e os filhos afetados homozigotos a partir daí, filtrou-se apenas as mutações que seriam homozigotas nos filhos e heterozigotas nos pais, além de alto impacto, foram usados os filtros SIFT = “deleterious” / “deleterious” e “low confidence”, “PolyPhen possibly”/“probably damaging” e obteve-se 10 genes mutados (Tabela 3).

Figura 7 - Heredograma Família A.

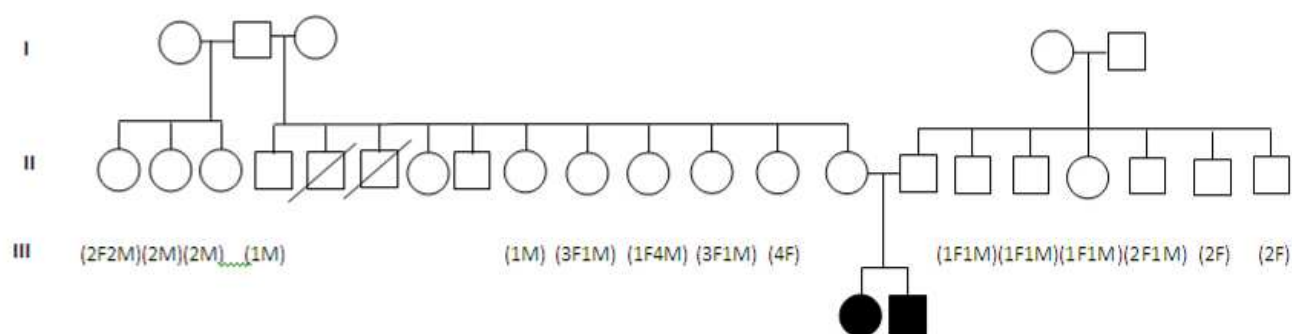


Tabela 3 - Genes com mutações encontrados na família A.

Gene	Função
<i>TMPRS6</i>	Transporte extracelular de intermembrana.
<i>PEPD</i>	Enzima de reciclagem de prolina, que faz controle produção de colágeno.
<i>MRC2</i>	Receptores de adesão celular, reparo tecidual.
<i>ITGB1</i>	Receptores de adesão celular, reparo tecidual.
<i>CTSL</i>	Receptores de adesão celular, reparo tecidual.
<i>LAMA5</i>	Regulador de glicoproteínas de matriz extracelular. A desregulação permite permeabilidade aumentada.
<i>COLA3</i>	Colágeno tipo V.
<i>KRT24</i>	Microfilamentos e micro túbulos e elasticidade.
<i>WDR66</i>	Regulação da motilidade do ciclo celular através de seu papel montagem dos raios axonemais radiais.
<i>RAD17</i>	Regulador de ciclo celular em fase G2.

Na família B assumiu-se um padrão de herança autossômico dominante, onde todos os membros estudados são afetados e heterozigotos. A partir disso, observa-se um padrão de penetrância incompleta (Figura 8). Quando analisado as 16 redes de interações funcionais e metabólicas eleitas, seguimos um padrão de filtro onde as mutações seriam heterozigotas de alto impacto, foram usados os filtros SIFT = “deleterious” / “deleterious” e “low confidence”, “PolyPhen” = “possibly”/“probably damaging” e obteve-se 8 genes mutados (Tabela 4).

Figura 8 - Heredograma família B.

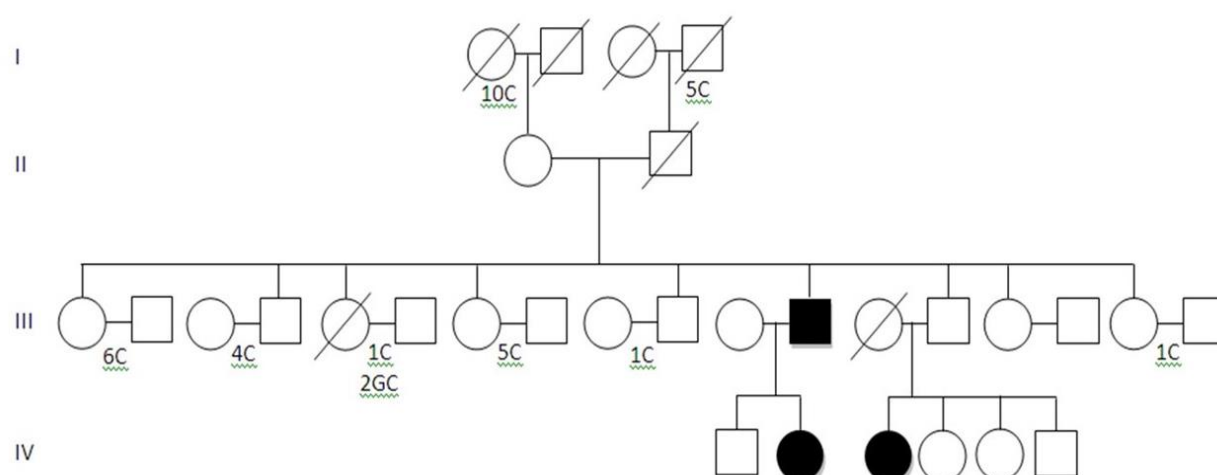
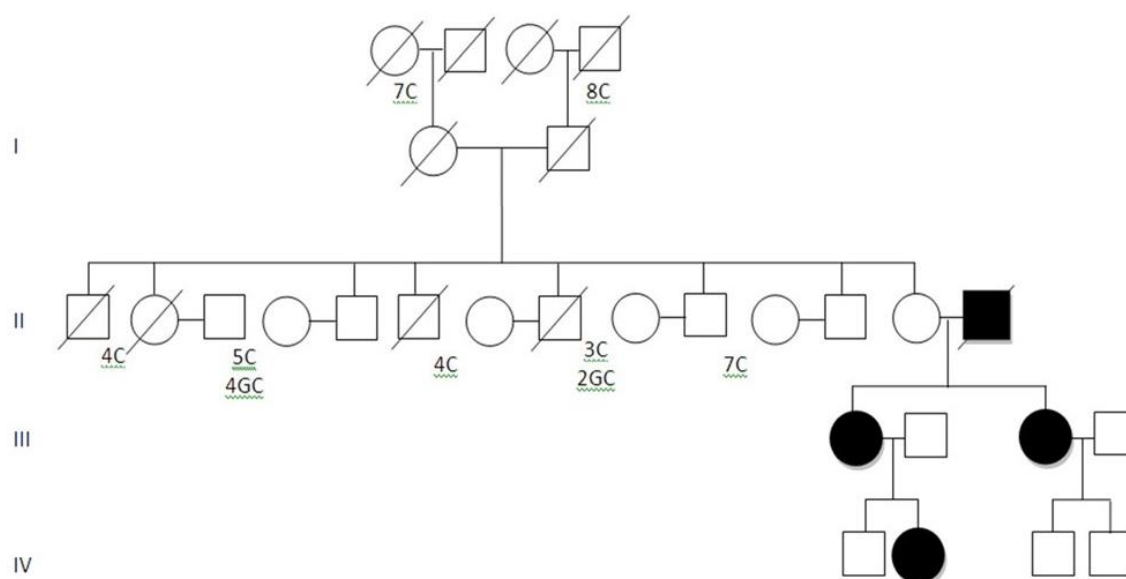


Tabela 4 – Genes com mutações encontrados na família B.

Gene	Função
<i>COL17A1</i>	Colágeno tipo XVII - proteína de transmembrana.
<i>FREMI</i>	Produção de proteínas de matriz extracelular.
<i>ADAM8</i>	Interação célula-célula e célula –matriz. Regulação de processos adesão celular.
<i>COL12A1</i>	Colágeno tipo XII. Precursor de colágeno tipo I, formador interações hialinas.
<i>LAMA2 e LAMA4</i>	Componente de membrana celular. Responsável por controle fluxo de substancias entre o meio e a célula.
<i>ZNF717</i>	Precursor de zinco, presente em micro modelação celular.
<i>COL4A3</i>	Colágeno tipo IV, formador de membranas celulares, e compõe de várias proteínas na matriz extracelular.
<i>COL6A6</i>	Colágeno tipo VI, precursor de várias proteínas celulares.

Na família C assumiu-se um padrão de herança autossômico dominante, onde todos os membros estudados são afetados e heterozigotos. A partir disso, observa-se um padrão de penetrância completa (Figura 9). Quando analisado as 16 redes de interações funcionais e metabólicas eleitas, seguimos um padrão de filtro onde as mutações seriam heterozigotas de alto impacto, foram usados filtros SIFT = “deleterious” / “deleterious” e “low confidence”, “PolyPhen” = “possibly” / “probably damaging” e obteve-se 8 genes mutados (Tabela 5).

Figura 9 - Heredograma da família C.**Tabela 5** - Genes com mutações encontrados na família C.

Gene	Função
<i>ITGB4</i>	Receptor de Glicoproteína de transmembrana, receptor de laminina.
<i>LAMA5</i>	Regulador de glicoproteínas de matriz extracelular. Sua desregulação permite permeabilidade aumentada.
<i>MACF1</i>	Forma pontes entre elementos do citoesqueleto, atuando diretamente em micromodelação e adesão celular.
<i>TRIOBP</i>	Organização do citoesqueleto atuante também em mobilidade celular.
<i>COL4A3</i>	Colágeno tipo IV, formador de membranas celular, e componente várias proteínas na matriz extracelular.
<i>COMP</i>	Principal regulador de MEC. Sua mutação está associada a doenças autossômicas recessivas não síndrômicas.
<i>ADAM8</i>	Interação célula-célula e célula-matriz. Regulação de processos de adesão celular.

Na família D assumiu-se um padrão de herança autossômico dominante, onde dentre os membros estudados os afetados seriam heterozigotos e o membro não afetado seria

homozigoto. A partir disso, observa-se um padrão de penetrância incompleta (Figura 9). Quando analisado as 16 redes de interações funcionais e metabólicas eleitas, seguimos um padrão de filtro onde as mutações seriam heterozigotas de alto impacto nos afetados e homozigotas no membro não afetado, foram usados filtros SIFT = “deleterious” / “deleterious” e “low confidence”, “PolyPhen” = “possibly” / “probably damaging” e obteve-se 7 genes mutados (Tabela 6).

Figura 9 – Heredograma família D.

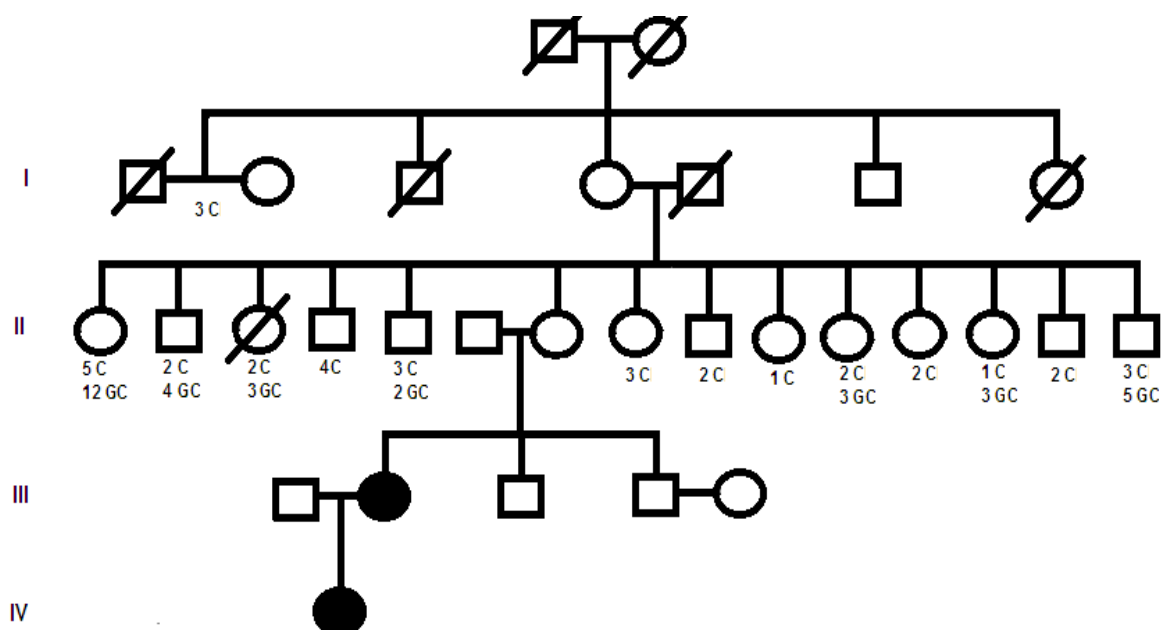


Tabela 6 - Genes com mutações encontrados na família D.

Gene	Função
<i>ADAMTS14</i>	Proteína de modulação. Ela cliva propeptídeos de colágeno tipo I, necessário para formação de fibras colágenas.
<i>COL14A1</i>	Regulação de fibrinogênese e produção de colágeno por fibroblastos.
<i>LAMC2</i>	Regulador de glicoproteínas de matriz extracelular. Sua desregulação permite aumento de permeabilidade.
<i>TNXB</i>	Está presente na composição da matriz extracelular, também atua em sua maturação.
<i>COL6A6</i>	Colágeno tipo VI, precursor de várias proteínas celulares.
<i>ELN</i>	É um dos dois componentes de fibras elásticas. Tem função na produção de prolina.
<i>SELE</i>	Adesão celular, estimula o acúmulo de materiais e substância interstício quando mutada.

6 DISCUSSÃO

A FGH é uma doença caracterizada por um padrão hereditário e etiológico muito heterogêneo (Chaurasia, 2014). Foram estudadas quatro famílias, com um total de doze pacientes. Quando observamos o padrão de transmissão hereditária, apenas a família A mostrou o padrão recessivo. Na família A os pais não eram afetados e o filho era afetado. Nas famílias B e C todos os estudados eram afetados e na família D apenas o pai não era afetado. Confirmando assim, a heterogeneidade nos padrões de herança da FGH. Alguns estudos já mostraram que, a doença geralmente se expressa com traços dominantes, porém também podendo ser descrita com traços recessivos (Bozzo et al., 1994; Garow et al., 2016).

Algumas análises de ligação genéticas de pacientes com FGH revelam várias alterações cromossômicas que podem conter mutações responsáveis por formas autossômicas dominantes não-sindrômicas da FGH (Margiotti et al., 2017). Os *loci* mais relatados foram *GINGF*, *GINGF2*, *GINGF3* e *GINGF4* localizados nos cromossomos 2p21-p22, 5q13-q2 e 11p15 (Garow et al., 2017). Uma inserção de base única de citosina no gene de *Son-de-Sevenless-1* (*SOS-1*) tem sido sugerida como uma possível causadora da FGH isolada, não sindrômica.

Entretanto, alguns trabalhos mostraram pacientes afetados pela FGH com mutações fora do gene *SOS-1* (Ma et al., 2014; Hwang et al., 2017). No estudo de Hwang et al. (2017), foi realizada uma análise a partir de exomas e decodificações de dados através de bioinformática em três gerações de uma família chinesa, onde a abordagem da análise foi realizada de maneira geral, levando em consideração algo comum entre os afetados. Foram encontradas mutações nos genes *TMCO1*, *INSR* e *RIN2*, que segundo os autores, teriam relação com a expressão fenotípica da FGH. Quando se observa as funções desses genes nota-se uma correlação com alguns aspectos clínicos, porém sem muita especificidade com a doença, como participação em falhas no desenvolvimento crânio facial ou participação em síndromes como a de Donohue. Porém, nenhum desses genes mostra associação direta com os tecidos gengivais. No trabalho de Ma et al. (2014), foram realizados sequenciamentos dos 23 exons do *SOS-1* de seis pacientes afetados por FGH de três famílias diferentes, e nenhuma alteração nesse gene foi encontrada.

No trabalho de Bayran et al. (2017) foram analisados 11 indivíduos FGH de 3 famílias distintas, analisando as vias de interações funcionais e metabólicas onde foram encontradas 3 mutações deletérias diferentes, porém dentre elas foram observados 2 genes com frames de

técnica e uma variante mutagênica na transcrição silenciosa em RE - Fator (REST). O fato de REST atua como um repressor transcricional sendo expresso em todo o corpo. O fator de REST tem papéis diferentes em diferentes contextos celulares, como oncogênicos, supressão de tumores e diferenciação hematopoiética e cardíaca. Assim como os achados deste trabalho sua associação na maior expressão da produção de colágeno está associada, sendo que tanto o fator de REST quanto o gene *SOS -1*, tem correlações com fatores oncogênicos, esses que tem uma correlação diferente com a FGH, pois temos uma produção exacerbada de colágeno e sua deposição na matriz extra celular dos tecidos gengivais, porém não sendo descontrolada.

No presente estudo foram analisadas redes de interações funcionais e metabólicas alteradas dos pacientes afetados, em cada família separadamente, assumindo um padrão hereditário heterogêneo interfamiliar e analisando um parâmetro de herança intrafamiliar exclusivo. Na família A após a utilização de vários os filtros nas análises de bioinformática, foi observado mutações importantes em 10 genes, dentre eles, destacam-se o *TMPRSS6*, *PEPD*, *MRC2*, *CTSL*, *WDR66* que tem funções de transporte de substâncias extracelulares na região de inter-membranas, enzimas de reciclagem de prolina (que faz controle na produção de colágeno), receptores de adesão celular e reparo tecidual, regulação da motilidade do ciclo celular através de seu papel na montagem dos raios axonemais radiais, respectivamente.

Kivirikko et al (1998) relatam que a prolina é um dos principais aminoácidos que compõe a estrutura do colágeno. Com a motilidade aumentada de substâncias do meio intracelular para o meio intercelular através da mutação nos genes *TMPRSS6* e *WDR66*, e a facilitação da deposição desse material através da falta de adesão celular causada pelo *MCR2*, pode-se ter uma possível associação de eventos que podem expressar fenotipicamente a FGH. O gene *WDR66* está localizado no *GINGF3*, dentro do cromossomo 5, que segundo Gowron et al (2016), é um locus muito bem descrito na literatura como um dos principais para expressão da FGH.

Outros genes com funções importantes também foram encontrados, como o *LAMA5* e o *COLA3*, com funções de regulação de glicoproteínas da matriz extracelular e formação de um dos principais colágenos presentes nos tecidos gengivais. O gene *RAD17*, encontrado mutado na família A, e também presente em *GINGF3*, é um regulador de ciclo celular, atuando com checkpoint na fase G2. Segundo Lee et al (2014) é nessa fase que a proliferação de fibroblastos está mais aumentada na FGH, produzindo uma maior quantidade de colágeno.

Porém, nesses últimos três citados foram encontrados mais de 4 *loci* de mutação em cada gene, o que pode significar um “frame” na técnica, ou seja, um artefato onde acontece deleção de um ou dois nucleotídeos, fazendo com que outras mutações possam interferir e sobrepor na exposição dos genes que sofreram deleção. Porém sua mutação é presente e considerável.

Nas famílias B e C foram analisadas apenas amostras de afetados assumindo que em ambas o padrão de herança seria autossômico dominante. Após a verificação das vias metabólicas alteradas, filtrando o que era comum em cada família individualmente.

Na família B, foram encontradas mutações em vários genes precursores de colágeno como *COL17A1*, *COL12A1*, *COL4A3*, *COL6A6*. Também foram encontradas mutações que aumentam a permeabilidade de fluxo dessa produção de colágeno desordenada entre o meio intercelular e a matriz extracelular através do *LAMA2* e *LAMA4*, desarranjo na micromodelação celular causada pela mutação em *ZNF17*, que é um importante precursor de zinco e facilitador da deposição desses materiais no meio extracelular devido a uma falha na adesão causada pela mutação em *ADAM8*, também encontrada na família B.

Na família C assim como na B, foram encontradas mutações em um gene precursor de colágeno (*COL4A3*), um gene responsável por adesão celular (*ADAM8*), assim como genes reguladores de motilidades substancial intra e intercelulares (*LAMA5*, *ITGB4* e *TRIOBP*). O gene *TRIOBP*, além de participar na manutenção do citoesqueleto através da membrana celular, é considerado um dos principais reguladores de MEC, sendo sua mutação associada a doenças autossômicas recessivas/dominantes não sindrômicas (Bradshaw et al., 2017). Sendo essas associações consideráveis, com altas possibilidades de expressar fenotipicamente a FGH.

Na família D, além de dois pacientes afetados, foi analisado um paciente não afetado, que serviu como filtro para eleição dos genes mutados através de vias de interação metabólicas alteradas. Foram encontrados genes precursores de colágeno, e regulação da produção do mesmo por fibroblastos (*COLA6* e *COL14A1*, respectivamente), genes de modulação, clivagem de pró-peptídeos de colágeno tipo I, onde sua falha podem pré-dispor ao acúmulo de colágeno (*ADAMTS14*), genes presente na composição, regulação de matriz extracelular, permitindo ou não o acúmulo de substancias intercelular (*LAMC2* e *TNXB*, *SELE* e *ELN*). Quando o acúmulo de substancias colagenosas é depositado na matriz extracelular, pode ser uma das causas da

FGH (Almiñana-Pastor et al., 2017).

Tendo em vista o provável potencial de transmissão dos genes supostamente responsáveis pela FGH para as gerações seguintes, convém ressaltar a importância do aconselhamento genético para o paciente e a família. Para futuros estudos são necessários um número maior de casos controle, tanto para realização da filtragem em bioinformática dos resultados dos exomas, quanto para validação através do sequenciamento de Sanger, pois assim a eficácia e veracidade dos dados terão melhor comprovação, tanto para comparação , quanto para fidedignidade dos resultados.

7 CONCLUSÃO

- A heterogeneidade de mutações na fibromatose gengival hereditária é ampla e variada entre grupos familiares e cada grupo familiar tem um padrão de herança distinto.
- Várias associações genóticas distintas podem atuar em conjunto tendo a mesma expressão fenotípica: a fibromatose gengival hereditária.
- A maioria dos casos teve como padrão de herança autossômico dominante, porém uma família relatada teve o padrão autossômico recessivo.
- São necessários mais casos controles para uma maior filtragem dos dados e para uma validação dos resultados, através do sequenciamento Sanger.

REFERÊNCIAS

Abhinav Bansal, Sumit Narang, K. Sowmya, Nidhi Sehgal. Treatment and two-year follow-up of a patient with hereditary gingival fibromatosis. *J Indian Soc Periodontol.* 2011; (4): 406–409.

Alon U, An Introduction to systems biology: design principles of biological circuits. Chapman & Hall/CRC. International Standard Book Number (ISBN): 2007.

Baptista IP. Hereditary gingival fibromatosis: a case report. *J Clin Periodontol.* 2002; (9): 871-874.

Bayran Y, et al. REST final exon truncating mutations cause hereditary gingival fibromatosis. *Hum Gen.* 2017. (9) 157-161.

Bansal A, Narang S, Sowmya K, Sehgal N. Treatment and two-year follow-up of a patient with hereditary gingival fibromatosis. *J Indian Soc Periodontol.* 2011; (4): 406-409.

Brown RS, Trejo PM, Weltman R, et al. Treatment of a patient with hereditary gingival fibromatosis: a case report. *Spec Care Dentist.* 1995; (15): 149-153.

Bozzo L, de Almedia OP, Scully C, Aldred MJ. Hereditary gingival fibromatosis. Report of an extensive four-generation pedigree. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; (78): 452-454.

Babu KB, Kumar KP, Anuradha BR, Arora N. Hereditary gingival fibromatosis – A case report and management using a novel surgical technique. *Rev. Sul-bras. Odontol;* 2011; (8): 453-458.

Baer PN, Benjamin SD. *Periodontal Disease in Children and Adolescents.* 2nd ed. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1974; (12): 81-84.

Bonnaure-Mallet M, Tricot-Doleux S, Godeau GJ. Changes in extracellular matrix macromolecules in human gingiva after treatment with drugs inducing gingival overgrowth. *Arch Oral Biol.* 1995; (40): 393-400.

Bittencourt LP, Campos V, Moliterno LF, Ribeiro DP, Sampaio RK. Hereditary gingival fibromatosis : Review of the literature and a case report. *Quintessence Int.* 2000; (31): 415 - 417.

Barros SP, Merzel J, de Araujo VC, et al. Ultrastructural aspects of connective tissue in hereditary gingival fibromatosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; (92): 78-82.

Bradshaw NJ, Yerabham ASK, Marreiros R, Zhang T, Nagel-Steger L, Korth C. An unpredicted aggregation-critical region of the actin-polymerizing protein TRIOBP-1/Tara, determined by elucidation of its domain structure. *J Biol Chem.* 2017; (52): 1209-1214.

Chavrier C.A, Couble, M.L. Ultrastructural immunohistochemical study of interstitial collagenous components of the healthy human keratinized mucosa surrounding implants. *Int Oral Maxillofac Implants*, 1999; (14): 108-112.

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 Periodontal Res.* 1999; (34): 457-463.

Coletta RD, Graner E. Hereditary gingival fibromatosis: a systematic review. *J Periodontol.* 2006; (5): 753-764.

Clocheret K, Dekeyser C, Carels C, Willems G. Idiopathic gingival hyperplasia and orthodontic treatment: A case report. *J Orthod.* 2003; (30): 130-190.

Collan Y, Ranta H, Vartio T, Perheentupa J, Raeste AM. Histochemical and biochemical study of hereditary fibrous hyperplasia of the gingiva. *Scand J Dent Res.* 1982; (90): 120-128.

Chavrier C, Couble M.L, Magloire, Grimaud J.A. Connective tissue organization of healthy human gingiva. *J Periodontal Res*, 1984; (19): 221-229.

Chaurasia A. Hereditary gingival fibromatosis. *Natl J Maxillofac Surg*. 2014; (1): 142-146.

DeAngelo S, Murphy J, Claman L, Kalmar J, Leblebicioglu B. Hereditary gingival fibromatosis-a review. *Compend Contin Educ Dent*. 2007; (3): 138-143.

Duncan MR, Berman B. Persistence of a reduced-collagen-producing phenotype in cultured scleroderma fibroblasts after short-term exposure to interferons. *J Clin Invest*. 1987; (79): 318-324.

Fletcher J. Gingival abnormalities of genetic origin: a preliminary communication with special reference to hereditary generalized gingival fibromatosis. *J Dent Res*. 1966; (45): 597-612.

Farrer-Brown G, Lucas RB, Winstock D. Familial gingival fibromatosis: an unusual pathology. *J Oral Pathol*. 2001; (1): 76-83.

Gawron K, Łazarz-Bartyzel K, Potempa J, Chomyszyn-Gajewska M. Gingival fibromatosis: clinical, molecular and therapeutic issues. *Orphanet J Rare Dis*. 2016; (27): 11-19.

Gawron K, Bereta G, Nowakowska Z, Łazarz-Bartyzel K, Potempa J, Chomyszyn-Gajewska M, Górska R, Plakwicz P Analysis of mutations in the SOS-1 gene in two Polish families with hereditary gingival fibromatosis. *Oral Dis*. 2017; (20): 30-36.

Gawron K, Łazarz-Bartyzel K, Fertala A, Plakwicz P, Potempa J, Chomyszyn-Gajewska M. Gingival Fibromatosis with Significant De Novo Formation of Fibrotic Tissue and a High Rate of Recurrence. Version 2. *Am J Case Rep*. 2016 Sep 9 [revised 2016 Sep 13]; (17): 655-659.

Goldblatt J, Singer SL. Autosomal recessive gingival fibromatosis with distinctive facies. *Clin Genet*. 1992; (42): 06-08.

Han XY, Wang W, Myllyla R, Virtanen P, Karpakka J, Takala TE. mRNA levels for alpha-subunit of prolyl 4-hydroxylase and fibrillar collagens in immobilized rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*; (20): 30-36.

Hermanns-Lê T, Piérard G.E. Ultrastructural alterations of elastic fibers and other dermal components in Ehlers-Danlos syndrome of the hypermobile type. *Am J Dermatopathol*, 2007; (29): 370-373.

Hwang J, Kim YL, Kang S, Kim S, Kim SO, Lee JH, Han DH. Genetic analysis of hereditary gingival fibromatosis using whole exome sequencing and bioinformatics. *Oral Dis*. 2017; (1): 102-109.

James PL, Prasad SV. Gingival fibromatosis: report of case. *J Oral Surg*. 1971; (1): 55-59.

Jayachandran M, Kapoor S, Mahesh R. Idiopathic gingival fibromatosis rehabilitation: a case report with two-year follow up. *Case Rep Dent*. 2013; (52): 1209-1214.

Khan U, Mustafa S, Saleem Z, et al. Hereditary gingival fibromatosis diagnosis and treatment. *Pak Oral Dent J* 2012; (213): 226-231.

Kukkola L, Hieta R, Kivirikko KI, Myllyharju J. Identification and characterization of a third human, rat, and mouse collagen prolyl 4-hydroxylase isoenzyme. *J Biol Chem*. 2003; (278): 85-93.

Kanagotagi S, Sidana S, Rajguru S, Padhye A. Gingival Fibromatosis with Distinctive Facies - A Three-Generation Case Report. *J Clin Diagn Res*. 2015; 9(5): 50-55.

Kivirikko KI, Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases and their protein disulfide isomerase subunit. *Matrix Biol*. 1998; (16): 357-368.

Livada R, Shiloah J. Gummy smile: could it be genetic? Hereditary gingival fibromatosis. *J Tenn Dent Assoc*. 2012; (1): 23-26; quiz 27-28.

Lai B, Muenzer J, Roberts MW. Idiopathic gingival hyperplasia: A case report with a 17-year follow up. *Case Rep Dent*. 2011; (52): 1209-1214.

Lee, E. J., et al. Characterization of fibroblasts with Son of Sevenless-1 mutation. *J of Dent Res.* 2006; (11): 1050-1055.

Meng LY, Huang MJ, Ye XQ, Fan MW, Bian Z. Increased expression of collagen prolyl 4-hydroxylases in Chinese patients with hereditary gingival fibromatosis. *Arch Oral Biol.* 2007; (52): 1209-1215.

Ma Y, Sun Z, Hu Y, Liu Y, Jin L, Zhang F. Non syndromic hereditary gingival fibromatosis in three Chinese families is not due to SOS1 gene mutations. *Cell Biochem Biophys.* 2014; (3): 1869-1873.

Miller M, Truhe T. Lasers in dentistry: an overview. *J Am Dent Assoc.* 1993; (2): 32-35.

Martelli-Júnior H, Bonan PR, Dos Santos LA, Santos SM, Cavalcanti MG, Coletta RD. Case reports of a new syndrome associating gingival fibromatosis and dental abnormalities in a consanguineous family. *J Periodontol.* 2008; (7): 1287-1296.

Martelli-Júnior H, Lemos D.P, Silva C.O, Graner E, Coletta R.D. Hereditary gingival fibromatosis: report of a five-generation family using cellular. Proliferation analysis *J Periodontol.* 2005; (76): 299-305.

Meng L , Ye X, Fan M , Xiong X, Von den Hoff J.W, Bian Z.. Keratinocytes modify fibroblast metabolism in hereditary gingiva fibromatosis. *Arch Oral Biol.* 2008; (53): 1050-1057.

Martelli-Junior H, Cotrim P, Graner E, Sauk JJ, Coletta RD. Effect of transforming growth factor-beta1, interleukin-6, and interferon-gamma on the expression of type I collagen, heat shock protein 47, matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-2 by fibroblasts from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis. *J Periodontol.* 2003; (74): 296-306.

Pereira TN, Lewindon PJ, Smith JL, Murphy TL, Lincoln DJ, Shepherd RW, et al. Serum markers of hepatic fibrogenesis in cystic fibrosis liver disease. *J Hepatol.* 2004; (41): 576-583.

Poulopoulos A, Kittas D, Sarigelou A. Current concepts on gingival fibromatosis-related syndromes. *J of Invest and Clin Dent*. 2011; (3): 156-161.

Pego S.P, Coletta R.D, Mendes D.C, *et al*. Hereditary gingival fibromatosis: clinical and ultrastructural features of a new Family *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015; (20): 150-155.

Snyder CH. Syndrome of gingival hyperplasia, hirsutism and convulsions. *J Pediatr*. 1965;(67): 499-502.

Singer SL, Goldblatt J, Hallam LA, Winters JC. Hereditary gingival fibromatosis with a recessive mode of inheritance. Case reports. *Aust Dent J*. 1993; 38(6): 427-432.

Sakamoto R, Nitta T, Kamikawa Y, *et al*. Histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural studies of gingival fibromatosis: a case report. *Med Electron Microsc*. 2002; (35): 248-254.

Sato M, Hirayoshi K, Yokota S, Hosokawa N, Nagata K. Intracellular interaction of collagen-specific stress protein HSP47 with newly synthesized procollagen. *J Cell Biol*. 1996; (133): 469-483.

Shin GT, Khanna A, Ding R, Sharma VK, Lagman M, Li B, *et al*. In vivo expression of transforming growth factor beta-1 in humans: stimulation by cyclosporine. Transplantation. *Aust Dent J*. 1998; (65): 313-318.

Tripathi AK, Dete G, Saimbi CS, Kumar V. Management of hereditary gingival fibromatosis: A 2 years follow-up case report. *J Indian Soc Period*. 2015; (3): 342-344.

Tripton DA, Howell KJ, Dabbous MK. Increased proliferation, collagen, and fibronectin production by hereditary gingival fibromatosis fibroblasts. *J Periodontol*. 1997; (68): 524-530.

Zandinejad A, Atarodi M, Abdel-Azim T, Leonhart RM, Morton D . Complete oral rehabilitation of a patient with hereditary gingival fibromatosis: a clinical report. *J Prosthet Dent*. 2015; (1): 1-7.

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética.



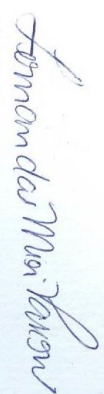
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "ANÁLISE DE EXOMA E SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DE PACIENTES COM FIBROMATOSE GENGIVAL HEREDITÁRIA.", protocolo nº 53509116.4, dos pesquisadores RODRIGO SOARES DE ANDRADE, HERCÍLIO MARTELLI JUNIOR e RICARDO DELLA COLETTA, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 15/06/2016.

The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School, University of Campinas, certify that the project "ANALYSIS EXOMA AND SEQUENCING OF PATIENTS WITH GENETIC FIBROMATOSIS GINGIVAL HEREDITARY", register number 53509116.4, of RODRIGO SOARES DE ANDRADE, HERCÍLIO MARTELLI JUNIOR and RICARDO DELLA COLETTA, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on Jun 15, 2016.



Prof. Fernanda Miori Pascon
 Secretária
 CEP/FOP/UNICAMP



Prof. Jacís Jorge Junior
 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
 Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.