



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Carolina Cavalcante Bitu

Orientador(a): Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Ano de Conclusão do Curso: 2005



TCC 248



Universidade Estadual de Campinas



Faculdade de Odontologia de Piracicaba

**PRESENÇA DE MIOFIBROBLASTOS NA FIBROMATOSE
GENGIVAL HEREDITÁRIA É HETEROGÊNEA E PODE
CONTRIBUIR PARA AS VARIAÇÕES EM SEUS
MECANISMOS BIOLÓGICOS**

Monografia apresentada ao
curso de Odontologia da
Faculdade de Odontologia
de Piracicaba – UNICAMP,
para obtenção do diploma de
Cirurgião Dentista

Orientador : Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

**Piracicaba
-2005-**

Dedicatória

Dedico este trabalho a meus pais, Hilacira e Francisco, que me deram apoio incondicional por todos esses anos. Gostaria também de dedicá-lo ao meu irmão Felipe, parte indispensável de meu crescimento e amadurecimento.

Demonstro meu carinho aos muitos amigos que me ajudaram nesta jornada, fascinante e penosa, que é a graduação em Odontologia.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pelas maravilhosas oportunidades que trouxeram a mais esta conquista.

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Piracicaba por ser uma instituição de excelência não só no ensino básico para a profissão, mas como referência em pesquisa científica e respeito ao paciente.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, por toda a dedicação e comprometimento com o ensino, que me inspiraram a perseguir com afinco uma carreira em pesquisa.

Novamente lembro dos meus amigos, indispensáveis para a conclusão deste trabalho e de muitos outros. Vocês permanecerão sempre no meu coração.

Sumário

1. Listas de Ilustrações	Página 5
2. Resumo	Página 6
3. Introdução	Página 8
4. Materiais e Métodos	Página 10
5. Resultados	Página 16
6. Discussão e Conclusões	Página 20
7. Figuras	Página 25
8. Referências Bibliográficas	Página 34

Listas

Tabela 1.....Página 14

Tabela 2.....Página 26

Figura 1.....Página 25

Figura 2.....Página 27

Figure 3Página 28

Figura 4.....Página 29

Figura 5.....Página 30

Figura 6.....Página 31

Figura 7.....Página 32

Figura 8.....Página 33

Resumo

A fibromatose gengival hereditária (FGH) é uma alteração benigna na qual ocorre o crescimento lento, indolor, não hemorrágico e fibroso do tecido gengival maxilar e mandibular. Os fibroblastos de FGH caracterizam-se por produção aumentada de colágeno e do fator de crescimento transformante- β 1 (TGF- β 1), o que resulta no aumento fibrótico na gengiva dos pacientes afetados. Em fibroses intersticiais, a presença de miofibroblastos, que são células conhecidas como principais produtoras de matriz extracelular, é exacerbada. O objetivo deste estudo foi determinar a presença e papel dos miofibroblastos na FGH. Fragmentos de tecido gengival e linhagens celulares de fibroblastos de duas famílias com FGH foram utilizados neste estudo, além de amostras de tecido e culturas primárias de gengiva normal (GN), usadas como controle. Para determinar a presença de miofibroblastos, analisamos a expressão do marcador específico para estas células, a isoforma α da actina de músculo liso (α -SMA). A expressão de α -SMA foi avaliada por RT-PCR (transcriptase reversa–reação em cadeia da polimerase), Western-blot, imunofluorescência e citometria de fluxo. A técnica de imunohistoquímica foi utilizada para determinar a expressão de α -SMA em tecidos gengivais de pacientes com GN e FGH. Os resultados mostraram uma expressão significativa de α -SMA nas células de uma das famílias de FGH deste estudo, sendo esta família designada como Família FGH2. Esta família também apresentou marcada expressão de TGF- β 1, CTGF (fator de crescimento de tecido conjuntivo) e colágeno tipo 1. Além disso, nas amostras teciduais submetidas a análise imunohistoquímica, esta família apresentou células com ampla marcação

para α -SMA. Já a família FGH1 apresentou uma expressão de α -SMA semelhante aos encontrados em GN, apesar de apresentar níveis aumentados de produção de TGF- β 1 e colágeno tipo 1 em comparação com as amostras controle (GN). A expressão de CTGF nos fibroblastos de FGH da família 1 foi significativamente inferior aos encontrados em FGH da família 2 e similares aos do grupo controle GN. Nossos resultados sugerem que a presença de miofibroblastos em FGH é dependente dos níveis de expressão de CTGF, e que mais de um mecanismo biológico está envolvido no aumento gengival observado nos pacientes portadores de FGH. Esta pode ser uma das causas da grande variação na expressividade clínica da doença.

Introdução

Fibromatose Gengival Hereditária (FGH) é definida como uma doença rara caracterizada por um aumento gengival fibrótico, benigno, assintomático e não-hemorrágico.^(1,2,3) Afeta homens e mulheres da mesma maneira com uma frequência fenotípica de 1:175.000.⁽⁴⁾ A severidade do crescimento gengival varia entre os indivíduos afetados. A gengiva queratinizada é um constituinte único e funcionalmente importante da mucosa mastigatória. Quando em excesso pode provocar problemas funcionais e estéticos como impedir a erupção dos dentes, que podem encontrar-se submersos parcial ou totalmente em tecido gengival fibrótico, prejudicando a mastigação, fonação e selamento labial.^(5,6) A FGH pode apresentar-se como uma desordem isolada ou fazer parte de uma síndrome, associada com outras características como a hipertricose, retardo mental, epilepsia, perda progressiva da audição e anormalidades nas extremidades, particularmente nos dedos das mãos e dos pés.^(7,8,9,10,11,12,13,14) A FGH tem um modo de herança autossômico dominante, mas raros casos de herança recessiva foram reportados. Esta doença apresenta variação na penetrância e expressividade.⁽⁵⁶⁾

A aparência histológica de FGH é caracterizada por uma mucosa de epitélio hiperplásico contendo finas papilas inseridas profundamente no tecido conjuntivo subjacente, sendo este rico em fibras colágenas.^(58,63) A mais proeminente manifestação patológica desta doença é o acúmulo excessivo de matriz extracelular, predominantemente colágeno tipo I.^(57,58) A FGH também é caracterizada por apresentar grandes quantidades de outras moléculas de matriz extracelular incluindo proteoglicanas, glicosaminoglicanas e fibronectina.^(64,65) Muitos estudos mostraram níveis transcricionais e traducionais elevados de

colágeno tipo I na gengiva e em culturas de fibroblastos derivados de pacientes com FGH.^(59,60) Resultados anteriores demonstraram que níveis autócrinos aumentados de TGF- β 1 controlam o acúmulo de matriz extracelular na FGH.

Fibroblastos de FGH produzem quantidades excessivas de TGF- β 1,^(61,62,63) o que é, em associação com a elevada síntese de colágeno, uma característica intrínseca de miofibroblastos.^(49,61) Miofibroblastos são células que exibem um fenótipo híbrido entre fibroblastos e células musculares lisas.⁽⁴³⁾ Estas células são caracterizadas pela expressão da isoforma α , específica, da proteína de músculo liso e quando ativadas sintetizam grandes quantidades de proteínas de matriz extracelular, em particular colágeno.^(44,45) Diversos trabalhos têm relatado a presença de células com características de miofibroblastos em tecidos especializados normais e em uma variedade de situações patológicas, como na doença de Dupuytren's, fibrose pancreática induzida por ciclosporina e fibrose pulmonar, renal e hepática.⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾ Além disso, miofibroblastos são o principal tipo celular envolvido em deposição de matriz extracelular durante reparação tecidual. Durante a reparação de ferida normal, miofibroblastos são transientes e participam ativamente na síntese de colágeno tipo I e III, tenascina, fibronectina e enzimas envolvendo a remodelação da matriz extracelular.^(49,50) Eles também estão envolvidos na contração da ferida.⁽⁴⁹⁾ Apesar de extensos estudos, o mecanismo exato da transdiferenciação de miofibroblastos é desconhecido. Evidências obtidas de modelos humanos e animais mostram que TGF- β 1 estimula a transdiferenciação de miofibroblastos. Este efeito tem sido observado em diversos tipos de células e condições de cultura, incluindo linhagens de células renais

humanas,⁽⁵¹⁾ fibroblastos pulmonares humanos⁽⁵²⁾ e células de rato.⁽⁵³⁾ No entanto, estudos recentes sugeriram que TGF- β 1 provavelmente não é um mediador direto da transformação de fibroblastos em miofibroblastos.^(54,55)

Como FGH é um excelente modelo para o estudo de características regulatórias de condições caracterizadas pela fibrose do tecido conjuntivo, as células de FGH têm propriedades específicas e assim produzem matriz extracelular abundante e sintetizam altos níveis de TGF- β 1 e miofibroblastos representam uma marca da fibrose intersticial, o propósito deste estudo é estabelecer se tecidos gengivais e culturas celulares derivadas de FGH expressam níveis alterados de α -SMA, que é um marcador específico de miofibroblastos, comparados a GN. Aqui demonstramos que provavelmente há mais de um mecanismo biológico resultando no aumento gengival dos pacientes. Apesar de fibroblastos isolados de duas famílias distintas afetadas pela FGH apresentaram níveis elevados de colágeno tipo I e TGF- β 1, apenas as células de uma destas famílias mostraram a presença de miofibroblastos.

Materiais e Métodos

Cultura de células e amostras de gengiva

Culturas de células gengivais de pacientes com GN e de membros de duas extensas famílias com FGH foram obtidas usando-se a técnica do explante como descrito anteriormente⁽¹⁶⁾. Apesar das duas famílias demonstrarem um padrão de

herança autossômico dominante, o padrão de expressão clínica (expressividade) e o grau de penetrância da doença são distintos nas 2 famílias.^(6,15) De uma família⁽⁶⁾ foram estabelecidas 5 linhagens celulares (para os propósitos deste estudo, esta família foi designada Família 1), e da outra⁽¹⁵⁾ foram estabelecidos 2 linhagens de fibroblastos (designada Família 2). Cinco linhagens de células de GN foram usadas para análise comparativa. As células foram mantidas em DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), contendo 10% de FBS (soro fetal bovino), 100 µg/ml de penicilina, 120 µg/ml de sulfato de kanamicina a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Para avaliar a influência do soro na expressão de α -SMA, as células foram cultivadas por 3 dias em soro contendo 0,1% de FBS anteriormente aos experimentos. Todos os experimentos foram realizados usando-se células entre a terceira e décima passagens.

Para a análise imunohistoquímica, amostras de GN e de FGH foram retiradas dos arquivos do Departamento de Patologia Oral da Universidade Estadual de Campinas. Novas secções foram feitas a partir de blocos de parafina e corados com hematoxilina e eosina (H&E) ou submetidos à análise imunohistoquímica para determinar a expressão de α -SMA. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Campinas. Todos os pacientes foram conscientizados do propósito do estudo antes de consentir em participar.

Imunohistoquímica para α -SMA foi realizada usando-se secções de 3 μ m de espécimes fixados em formalina a 10% e embebidos em parafina. Após remoção da parafina e hidratação em soluções de álcool de diferentes gradações, as secções foram tratadas com 3% de H_2O_2 seguidas por digestão com 10 mM de ácido cítrico pH 6 em forno de microondas por 24 minutos, divididos em 2 ciclos. Após lavagem com PBS, as secções foram tratadas com BSA (albumina sérica bovina) a 1% em PBS (salina tamponada com fosfato) por 1 hora, e então incubadas com anticorpos monoclonais de camundongo para α -SMA (Dako Corp., Carpinteria, CA, USA) com diluição 1:200, seguido pelo método ABC (StrepABC Complex/HRP Duet kit, Dako). As reações foram desenvolvidas incubando-se as secções com 0,6 mg/ml de 3,3'-(tetrahydroclorato de diaminobenzidina) (Sigma St. Louis, MO, USA) contendo 0,01% de H_2O_2 . Reações controle não apresentaram nenhuma coloração.

Transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

RNA total das células foi isolado de células de GN e de FGH com os métodos de Chomezinsky e Sacchi⁽¹⁷⁾ usando o reagente Trizol (Invitrogen). A concentração e pureza de cada amostra de RNA foram determinadas analisando-se a absorbância espectrofotometricamente a 260/280 nm de comprimento de onda. Após o tratamento com DNase I para eliminação de contaminação por DNA genômico, dois μ g de RNA total por amostra foram usadas para gerar uma biblioteca de cDNA usando a enzima Superscript II RNase H-Reverse (Invitrogen). Os cDNAs resultantes foram subsequente amplificados em uma solução de

25µl contendo 1µM de cada primer, 2mM MgCl₂, 0.8 mM dNTPs e 0.025 U/µl de Taq DNA polymerase (Invitrogen). A análise do gene gliceraldeído -3- fosfato desidrogenase (GAPDH) foi usado como controle das reações. Sequências de primers, condições de PCR e os tamanhos dos produtos de PCR para α-SMA, colágeno tipo 1, TGF-β1, CTGF, e GAPDH são mostrados na Tabela 1. Após a amplificação em um termociclador (Model 9700, Perkin Elmer, Foster City, CA, USA), 10 µl do produto de PCR foi submetido a eletroforese em um gel de agarose a 1% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio. As amplificações do PCR foram quantificadas através de análise densitométrica dividindo-se a densidade da banda da sequência de interesse pela do gene controle GAPDH.

Análise por Western Blot

Fibroblastos foram lavados com PBS gelado e lisados em tampão RIPA (50mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% ácido deoxicólato, 0.5% de sódio deodecil sulfato, 1 mM fluoreto de fenilmetilsufonil, 1mM N - etilmaleimida, 1mM ditiotrietol, 10 µg inibidor de tripsina de soja, 1µg/ml de leupeptina e 1µg/ml de aprotinina). Após centrifugação, as concentrações de proteína foram mensuradas utilizando-se o corante de Bradford (Bio Rad protein assay, Bio Rad, Hercules, CA, USA. Cinquenta µg de proteína total por amostra foram separados por eletroforese em um gel de poliamilomide a 10% (SDS-PAGE) sob condições redutoras, e transferidas para membranas de nitrocelulose (Invitrogen). As membranas foram bloqueadas por 2 horas com 10% de leite desnatado em PBS contendo 0,1% de Tween 20, enxaguadas na mesma solução

tampão, e incubadas por 1 hora com anticorpos anti- α -SMA ou anti- β -actina diluído em PBS com 5% de leite em concentrações respectivas de 1:200 e 1:40.000. Após lavagem com PBS, as membranas foram reveladas usando-se o kit de quimioluminescência para Western blot (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL, USA).

Tabela 1. Primers usados nos ensaios de RT-PCR.

Gene	Sequence (5' → 3')	Temperatura anelamento	Número de ciclos	Produto (pb)
	Sense: GCTCACGGAGGCACCCCTGAA			
α -SMA	Antisense: CTGATAGGACATTGTTAGCAT	61	40	589
	Sense: CTGGCAAAGAAGGCGGCAAA			
Coláge no tipo I	Antisense: CTCACCACGATCACCACTCT	58	25	503
	Sense: AAGTGGATCCAGGAGCCCAA			
TGF- β 1	Antisense: GCTGCACTTGCAGGAGCGCAC	55	30	247
	Sense: AACTATGATTAGAGCCAACTGCCTG			
CTGF	Antisense: TCATGCCATGTCTCCGTACATCT	55	35	477
	Sense: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC			
GAPDH	Antisense: GAAGATGGTGATGGGATTTC	55	30	226

Imunofluorescência

Fibroblastos foram plaqueados em uma densidade de 5×10^3 células por poço, em uma lâmina de cultura de células (Lab Tek, Nunc, Naperville, IL, USA) e incubados a 37°C em ar umidificado contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Seguindo-

se incubação por 3 dias em meio com 0,1% de FBS, as células foram lavadas com PBS e fixadas com etanol 70% por 15 minutos. Para prevenir ligações não-específicas, as células foram bloqueadas com 3% de BSA em PBS por uma hora. As células foram incubadas por 1 hora com anticorpos anti- α -SMA de camundongo diluídos a 1:100, seguindo-se a incubação com anticorpos IgG anti-rato conjugada com fluoresceína (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) a 1:250. As células foram montadas com Vectashield contendo DAPI, e então examinadas com um fotomicroscópio equipado com epifluorescência (DMR Microscope, Leica Microsystems, Germany). Para gerar imagens fluorescentes, as células foram excitadas a 480/40 nm com um filtro em banda que permite a passagem de 527/30 nm. Células não tratadas com anticorpos primários foram utilizadas com controles negativos.

Citometria de Fluxo

Suspensões de células foram fixadas com etanol a 70%, e coradas para α -SMA como descrito acima. As células foram lavadas, ressuspendidas em PBS, e analisadas no Citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San José, CA, USA). Um mínimo de 10.000 eventos foi captado para cada amostra, e apenas as células com características de dispersão ortogonal e adiante, similares a fibroblastos intactos, foram incluídos na análise. A análise quantitativa foi realizada com a ajuda do software LYSIS (Becton Dickinson), medindo a porcentagem de células positivas e a média de intensidade de fluorescência.

Análise Estatístico

Os resultados são apresentados como media $\pm$ desvio padrão. Análise de variancia com modificações baseadas no test de Tukey foi realizada para comparação entre os grupos. O teste de Spearman foi utilizado para determinar a correlação entre os níveis de expressão de colágeno tipo I e TGF- β 1. Em nossas análises comparativas, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Expressão de α -Sma em amostras de FGH e GN

O exame histológico do tecido gengival das famílias 1 e 2 coradas com hematoxilina e eosina (HE) revelou achados muito similares. Os tecidos gengivais foram compostos por um epitélio bem estruturado com finas criptas epiteliais inseridas profundamente no tecido conjuntivo fibroso, o qual apresentava feixes de com fibras colágenas em todas as direções. Para determinar a presença de miofibroblastos nestes espécimes gengivais realizamos a análise imunohistoquímica contra a proteína α -SMA. Esta análise revelou que todas as amostras de GN ($n=11$) foram negativas para α -SMA no tecido conjuntivo, exceto nas paredes musculares dos vasos sanguíneos (controle positivo interno) (Figura 1). Nas mostras da família 1 ($n=12$), apenas uma amostra revelou uma pequena área focal com células positivas para α -SMA, enquanto as outras 11 amostras foram negativas no tecido conjuntivo. Já as células de FGH da família 2

apresentaram marcação positiva e dispersa para α -SMA, um achado comum para todas as amostras estudadas desta família (n=4). (Tabela 2) Interessantemente, áreas com infiltrado inflamatório de intenso a moderado mostraram uma redução no número de células positivas.

Expressão de α -SMA em células de GN e FGH

Para determinar se as células derivadas dos pacientes da família 2 demonstravam uma proporção alterada de miofibroblastos comparado com as células de FGH da família 1 e GN, um número de modalidades foi empregado, o que incluiu análises por RT-PCR, Western blot, imunofluorescência e citometria de fluxo. A análise semi-quantitativa por RT-PCR foi usada neste estudo para determinar os níveis basais de expressão α -SMA mRNA nas linhagens de células derivadas de pacientes com FGH e GN. *In vitro*, os fibroblastos GN expressaram constitutivamente níveis pequenos, mas detectáveis de mRNA para α -SMA (Figura 2). Nenhuma diferença foi observada na expressão de α -SMA entre as linhagens pertencentes aos grupos GN e FGH da família 1, enquanto que os fibroblastos de FGH da família 2 expressaram claramente níveis mais altos de mRNA para α -SMA tanto em baixa (0.1%) quanto em alta (10%) concentração de soro fetal bovino. Para confirmar estes achados foi realizada análise por Western blot, demonstrando que as células da FGH família 2 produziram maior quantidade de α -SMA do que as células de GN e FGH família 1 (Figura 3). Os fibroblastos cultivados em baixos níveis de soro (0,1%), independentemente do grupo,

mostraram um aumento na expressão e produção de α -SMA comparado com células cultivadas em níveis maiores de soro (10% FBS).

A distribuição e proporção de células positivas para α -SMA em culturas de GN e FGH foram examinadas usando-se análise de microscopia por imunofluorescência (Figura 4) e citometria de fluxo (Figura 5). Os fibroblastos de GN e FGH demonstraram marcação perinuclear vívida para α -SMA, com uma proporção de células positivas para α -SMA bem semelhantes entre eles. As células de FGH da família 2 demonstraram células com dois padrões distintos de distribuição: uma marcação perinuclear muito similar à de FGH da família 1 e GN, e outra caracterizada por uma marcação brilhante estriada por todo o citoplasma o que pode ser correlacionado com o padrão de fibras de estresse como relatado anteriormente. Como esperado, os fibroblastos da família 2 demonstraram maior intensidade de fluorescência e um número maior de células positivas para α -SMA comparadas com o controle. A porcentagem de células positivas para α -SMA no grupo FGH da família 2 variaram de 79 a 90% com uma média de $85,05\% \pm 6,81$, enquanto que para o grupo GN esta porcentagem variou entre 31 a 42% com uma média de $37,08\% \pm 3,62$, e para o grupo FGH da família 1 variou de 34 a 46% com uma média de $42,41\% \pm 4,54$.

Células de FGH expressaram altos níveis de TGF- β 1 e colágeno tipo 1

Para demonstrar que fibroblastos de FGH têm níveis maiores de expressão de TGF- β 1 e colágeno tipo 1 do que fibroblastos de GN, a análise por RT-PCR foi realizada usando-se RNA total isolado de culturas de fibroblastos estabelecidos de

GN, FGH da família 1 e FGH da família 2 (Figura 6). Análise densitométrica dos produtos de PCR, após normalização pelo valor do gene GAPDH, demonstrou que os níveis de mRNA para colágeno tipo 1 foram estatisticamente maiores em culturas de fibroblastos de ambas as famílias de FGH do que nas amostras controle de GN, nas amostras mantidas em meio com 0,1% ($p < 0,05$ para o grupo de FGH da família 1 e $p < 0,001$ para o grupo FGH da família 2) e em meio com 10% de FBS ($p < 0,05$ para ambas as famílias). As células de FGH da família 2, em meio contendo 0,1% de soro, mostraram níveis significativamente maiores de colágeno tipo 1 quando comparados aos fibroblastos de FGH da família 1 ($p < 0,05$). A expressão de colágeno tipo 1 foi significativamente maior em fibroblastos cultivados em meio contendo 0,1% de soro do que em meio contendo 10% de soro, independentemente do grupo de linhagem celular ($p < 0,01$) (Figura 7). Os níveis de mRNA para TGF- β 1 também foram significativamente mais altos em fibroblastos tanto da família 1 quanto da família 2 quando comparados com fibroblastos de GN, mas para o grupo de FGH da família 1 isto ocorreu apenas quando as células foram cultivadas em DMEM contendo FBS a 0,1%. A expressão de TGF- β 1 foi significativamente maior no grupo de FGH da família 2, em meio contendo 10% e 0,1% de soro, do que no grupo de FGH da família 1 ($p < 0,01$).

Expressão de CTGF é alta em fibroblastos de FGH da família 2

Visto que as culturas de FGH de família 2 demonstraram a presença de miofibroblastos e uma maior expressão de TGF- β 1 do que os fibroblastos de FGH da família 1, e sabendo-se que TGF- β 1 induz a transdiferenciação de fibroblastos

em miofibroblastos através da estimulação de uma via dependente de CTGF, procuramos determinar se os níveis de expressão de CTGF poderiam explicar a diferença na presença de miofibroblastos entre as famílias 1 e 2 de FGH. A análise por RT-PCR mostrou que a expressão de CTGF é significativamente mais alta nas linhagens de FGH da família 2 comparado com o controle e células de FGH da família 1, em meio contendo 0,1% e 10% de soro (Figura 8). Adicionalmente, a expressão de CTGF foi bastante similar entre os grupos GN e FGH da família 1. Portanto, a presença de miofibroblastos em FGH da família 2 pode ser devido aos altos níveis de expressão de CTGF.

Discussão e Conclusões

Apesar dos mecanismos básicos que induzem a fibrose gengival em pacientes com FGH ainda permanecerem obscuros, tem sido proposto que o aumento gengival se desenvolve através da ativação ou seleção de fibroblastos teciduais residentes, fenotipicamente caracterizados por um aumento na proliferação, baixos níveis de síntese de metaloproteinases degradantes de matriz extracelular (MMP-1 e MMP-2), e produção elevada de colágeno^(16,19,20). Além disso, a estimulação autócrina por quantidades excessivas de TGF- β 1 produzidas pelos fibroblastos de FGH parece contribuir para estes fenótipos.^(20,21,22) Uma crescente lista de evidências tem conectado miofibroblastos com a patogênese de diversos processos patológicos fibróticos, levando-se em conta que eles são a principal fonte do aumento de deposição de matriz extracelular.^(18,23,24,25) A citocina regulatória TGF- β 1 tem sido tradicionalmente considerada um indutor de fenótipos

de miofibroblastos tanto *in vivo* quanto *in vitro*.^(26,27,28) Como as células de FGH apresentam seu fenótipo ativado na presença de níveis elevados de TGF- β 1, nós estávamos interessados em determinar se miofibroblastos poderiam representar um papel na fibrose gengival em FGH. Para o nosso melhor conhecimento, nenhuma investigação anterior foi feita para analisar a presença de miofibroblastos em culturas gengivais ou tecidos de pacientes com FGH. Neste estudo nós determinamos que houve uma expressão aumentada de α -SMA pelas culturas de fibroblastos comparado com o controle GN em das famílias estudadas (FGH da família 2), mas não na outra família (FGH família1). Adicionalmente, a expressão de α -SMA foi amplamente observada nos fibroblastos lesionais de todos os tecidos gengivais de FGH da família 2, como revelado por coloração imunohistoquímica, enquanto que não houve coloração para a FGH da família 1 com exceção de uma amostra que mostrou uma pequena área focal contendo células positivas para α -SMA. Interessantemente α -SMA foi detectado em baixos níveis nas culturas *in vitro* de FGH da família 1 e GN, mas não *in vivo*, o que provavelmente se deu devido à indução de fibras de estresse associado com culturas celulares, apesar das diferenças de sensibilidade dos testes realizados *in vivo* possam ter contribuído para este fato. Além disso, houve claramente uma proporção de células negativas para α -SMA em todas as linhagens celulares tanto de FGH e de gengiva normal, sugerindo heterogeneidade na expressão de α -SMA nas subpopulações de fibroblastos. Tais variações podem ser atribuídas à subpopulação de fibroblastos que existe na gengiva e periodonto⁽²⁹⁾. Levando-se em conta o fato de que α -SMA é o marcador específico para miofibroblastos, estes

resultados sugerem fortemente que miofibroblastos estão envolvidos na patogênese do crescimento gengival da FGH da família 2, mas não na FGH da família 1.

Diversas evidências têm demonstrado que a FGH é clinicamente, geneticamente e biologicamente heterogênea. Com relação à doença nas famílias aqui estudadas, sabemos através de estudos anteriores que existem diferenças clínicas e genéticas^(6,15). Apesar de em ambas as famílias a doença manifestar-se como um crescimento gengival isolado e generalizado, na família 1 este é mais severo e freqüentemente associado com problemas tanto estéticos quanto funcionais, incluindo diastemas, mal posicionamento dental, retenção prolongada da dentição decídua, erupção atrasada, mordidas cruzadas e abertas, proeminência labial e postura de lábios abertos⁽³⁰⁾. Além disso, a recorrência é mais freqüente em pacientes da família 1 do que em pacientes da família 2. Enquanto a penetrância gênica é incompleta e muito baixa na FGH da família 2, como revelado pelo risco de recorrência entre filhos de 0,078 (7,8%) e um risco de recorrência entre irmãos de 0,085 (8,5%), na FGH da família 1 esta é completa com aproximadamente metade dos descendentes afetados pela FGH. Em adição, os indivíduos não afetados da família 2 transmitem a FGH como um padrão autossômico dominante para seus filhos sem eles mesmos terem sido afetados clinicamente. Neste estudo adicionamos heterogeneidade para FGH, demonstrando que miofibroblastos estão associados com o crescimento dos tecidos gengivais na FGH da família 2. Estes achados sugerem que nem todas as FGHs são iguais, e suportam a existência de mais de um mecanismo resultando na manifestação clínica da doença. Estudos futuros deverão elucidar se os

mecanismos biológicos da FGH correlacionam-se com formas geneticamente distintas de FGH ou com uma expressão variável de uma mutação gênica comum, mutações alélicas, ou não-alélicas.

A identificação dos elementos regulatórios da transdiferenciação dos miofibroblastos é de considerável importância para o entendimento molecular dos mecanismos de fibrose intersticial em geral, assim como na FGH. Atualmente é sugerido que a transdiferenciação de miofibroblastos é criticamente dependente de TGF- β 1. TGF- β 1, uma citocina multifuncional com propriedades fibrogênicas, tem sido implicada na patogênese de fibroses em diversos órgãos em modelos experimentais e humanos.^(31,32) Isto é ilustrado mais claramente pela superexpressão deliberada de TGF- β 1 nos tecidos normais, o que resulta em fibrose.^(33,34) Em adição, TGF- β 1 estimula a deposição de matriz extracelular pelo aumento da síntese por um lado e inibindo sua degradação por outro lado.^(21,35,36) Estudos recentes têm indicado que CTGF representa um papel crucial na mediação de várias ações fibróticas de TGF- β 1. Por exemplo, CTGF tem sido reportada por mediar a transdiferenciação de miofibroblastos e a síntese de matriz extracelular mediada por TGF- β 1.^(37,38,39,40) Além disso, um estudo recente demonstrou que TGF- β 1 através da via dependente de CTGF controla a transdiferenciação de fibroblastos em miofibroblastos com uma participação funcional de IGF-2.⁽⁴¹⁾ TGF- β 1-CTGF sinergizam-se com IGF-2 para estimular a transdiferenciação de miofibroblastos com um subsequente aumento na síntese de colágeno. Além disso, um estudo recente demonstrou que CTGF liga-se a TGF- β 1, resultando em estimulação desta atividade.⁽⁴²⁾ Em ambas as famílias os níveis de TGF- β 1 estavam aumentados mas os níveis de expressão de CTGF

foram mais altos nos fibroblastos da família 2 em meio com níveis altos ou baixos de soro, o que correlaciona-se com a presença de miofibroblastos. Portanto a elevação dos níveis de TGF- β 1 isoladamente parece insuficiente para induzir a transdiferenciação de miofibroblastos.

Coletivamente, estes achados sugerem que elevados níveis de CTGF são necessários para a transdiferenciação de miofibroblastos. Interessantemente, a coloração de CTGF é significativa em tecidos gengivais com crescimento induzido por fenitoína, mas não no crescimento gengival induzido por ciclosporina ou nifedipina.⁽⁴³⁾ Estudos futuros serão necessários para determinar o papel exato da CTGF na patogênese das diferentes formas de FGH.

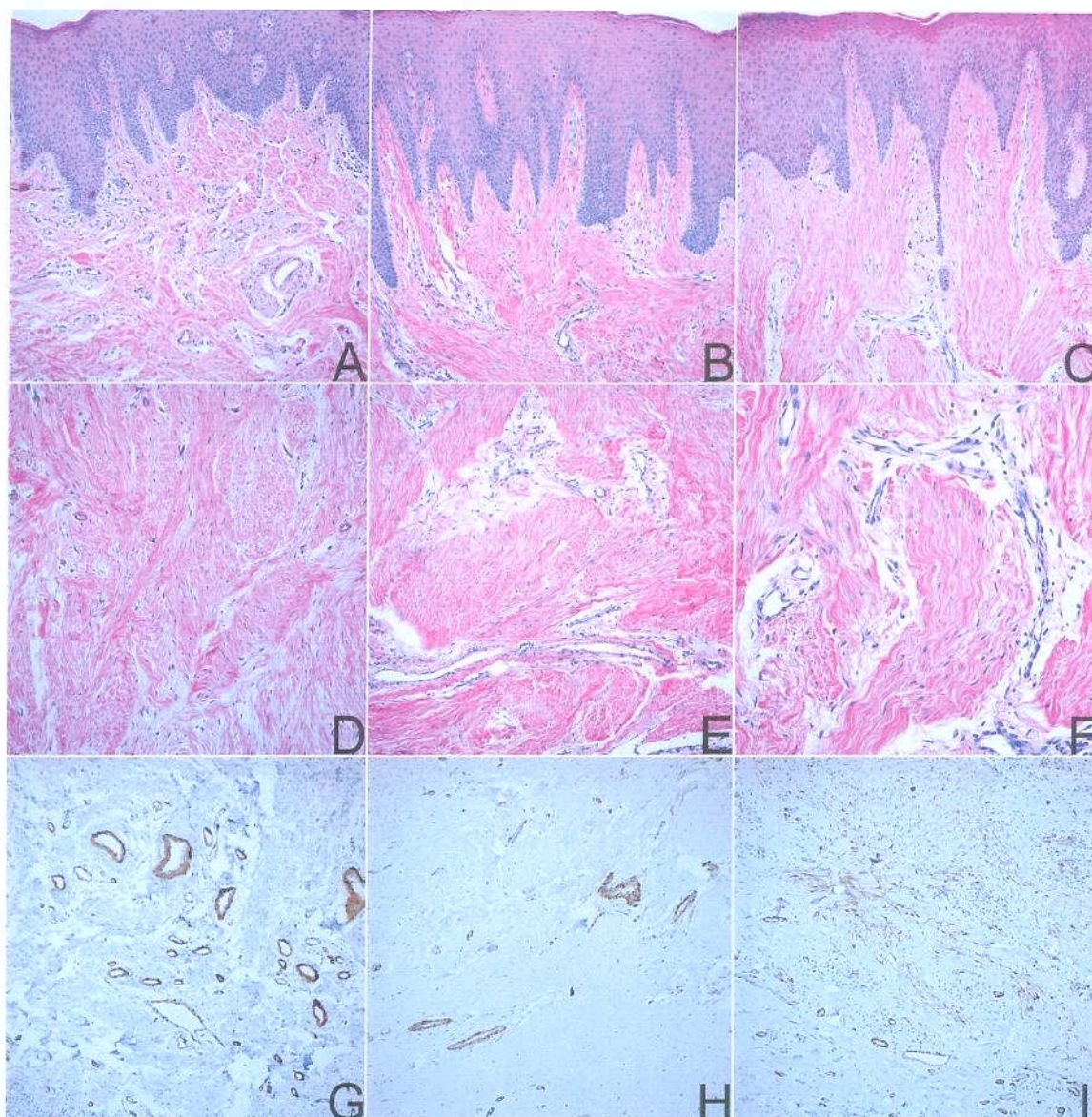


Figura 1. Cortes histológicos representativos das três amostras de tecido gengival utilizadas neste estudo. As amostras referentes às letras A, D e G são de GN, as amostras identificadas com as letras B, E e H são de FGH da família 1 e as identificadas com as letras C, F e I são de FGH da família 2. As amostras G, H e I foram submetidas a análise imunohistoquímica para detecção de α -SMA.

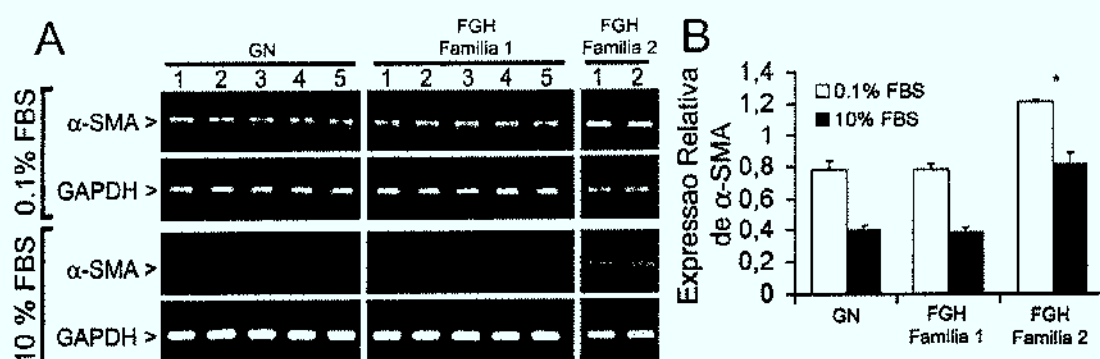


Figura 2. Análise da expressão de α -SMA por RT-PCR em culturas primárias de células de GN, FGH da família 1 e FGH da família 2. RNA total foi extraído, convertido em cDNA e submetido a análise por PCR utilizando-se primers específicos para α -SMA e GAPDH. (A) Separação eletroforética dos produtos de amplificação em gel de agarose contendo brometo de etídeo. (B) Análise densitométrica da expressão de α -SMA nos grupos GN, FGH família 1 e FGH família 2. * $p < 0,05$

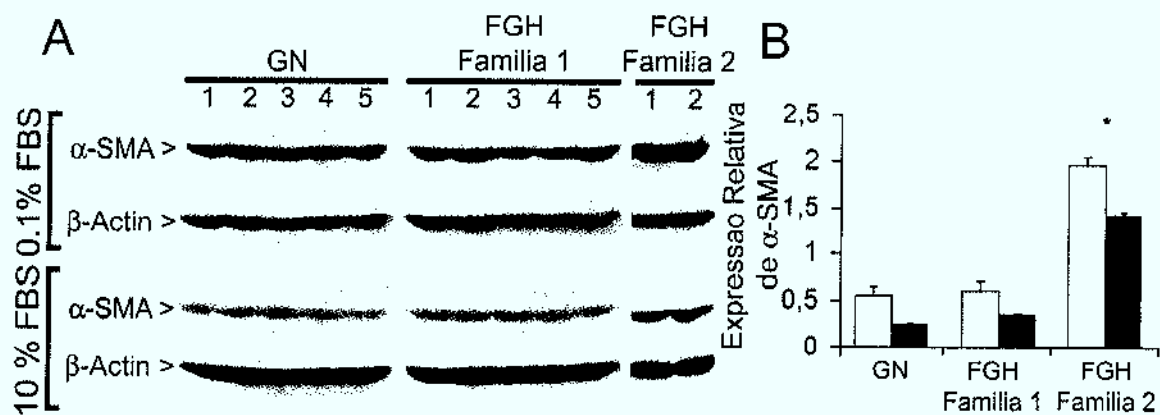


Figura 3. Produção de α -SMA por fibroblastos de GN, FGH família 1 e FGH família 2. Proteína total das culturas celulares foram isoladas, separadas eletroforéticamente, transferidas para membranas de nitrocelulose e analisadas por western blot utilizando anticorpos contra α -SMA e β -actin. (A) Análise por western blot e (B) análise densitométrica. * $p < 0,05$

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
BIBLIOTECA

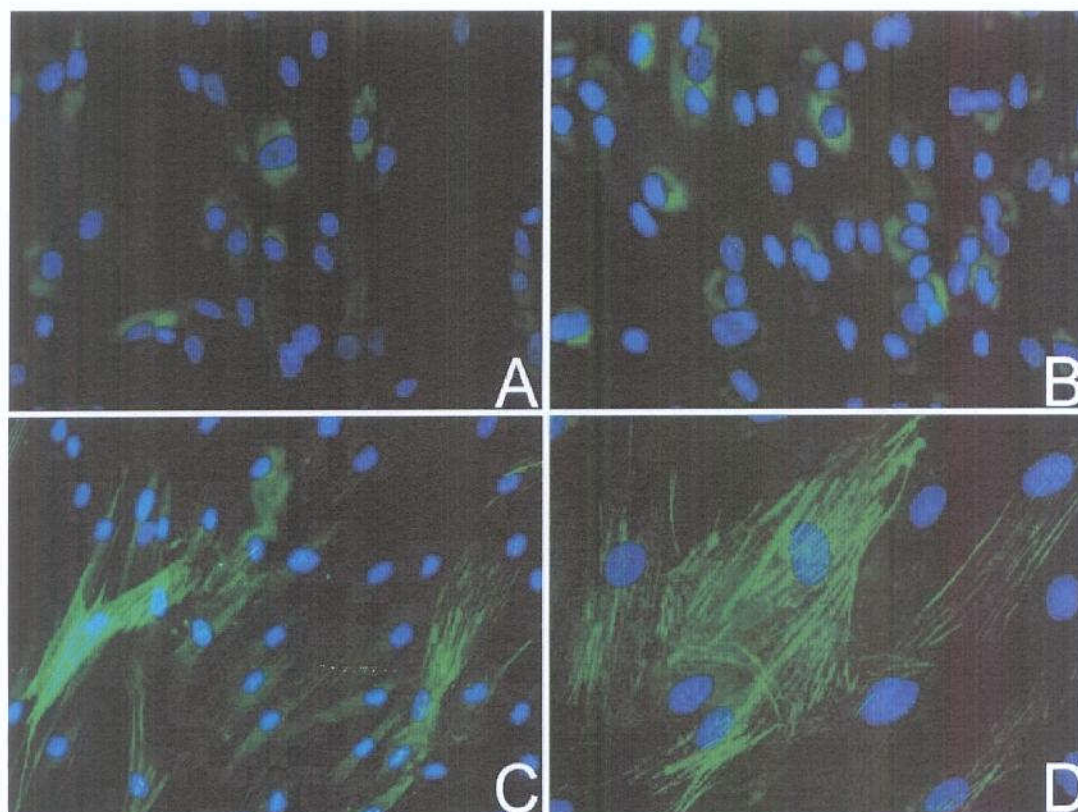


Figura 4. Distribuição de α -SMA nas culturas celulares de GN, FGH família 1 e FGH família 2. Painéis A e B revelam a distribuição de α -SMA em GN e FGH da família 1, respectivamente, enquanto que os painéis C e D demonstram os resultados observados pra FGH da família 2. Nas amostras da família 2 foi observado uma distribuição por todo o citoplasma em um padrão fibrilar.

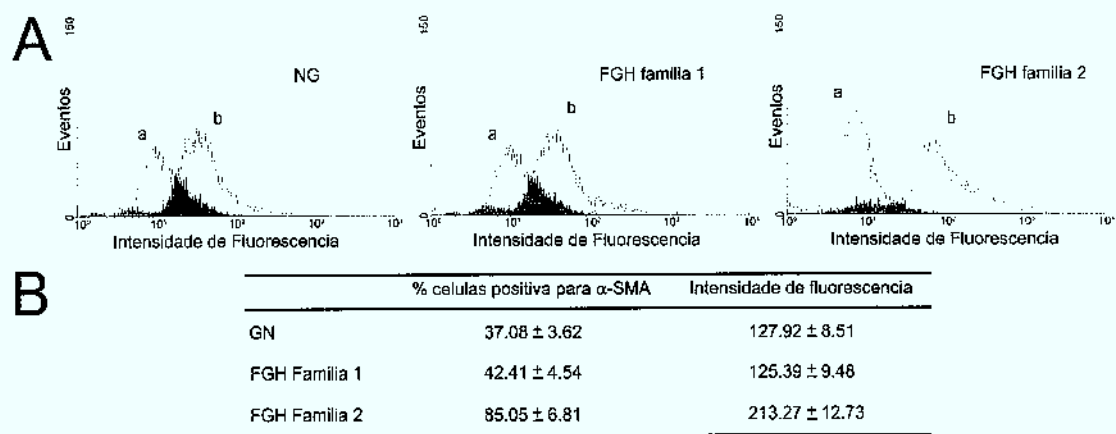


Figura 5. Análise citométrica da expressão α-SMA em culturas primárias de GN, FGH da família 1 e FGH da família 2. Células em suspensão foram fixadas e coradas com anticorpos produzidos em camundongos contra a proteína α-SMA humana seguido por anticorpos anti-IgG de camundongos conjugado a fluoresceína. A porcentagem de células positivas e a media da intensidade de fluorescência foram calculadas com o auxílio de um citômetro de fluxo e um software específico. (A) Histograma representativo de uma das amostras de cada grupo estudado com a letra (a) representando as células controle negativo (não incubadas com os anticorpos primários) e (b) representando as células positivas para expressão de α-SMA. (B) Media da porcentagem de células positivas e da intensidade de fluorescência para os grupos GN, FGH família 1 e FGH família 2. Note que as culturas celulares da família 2 apresentam um maior número e uma maior intensidade de fluorescência comparado com os grupos controle e FGH família 1.

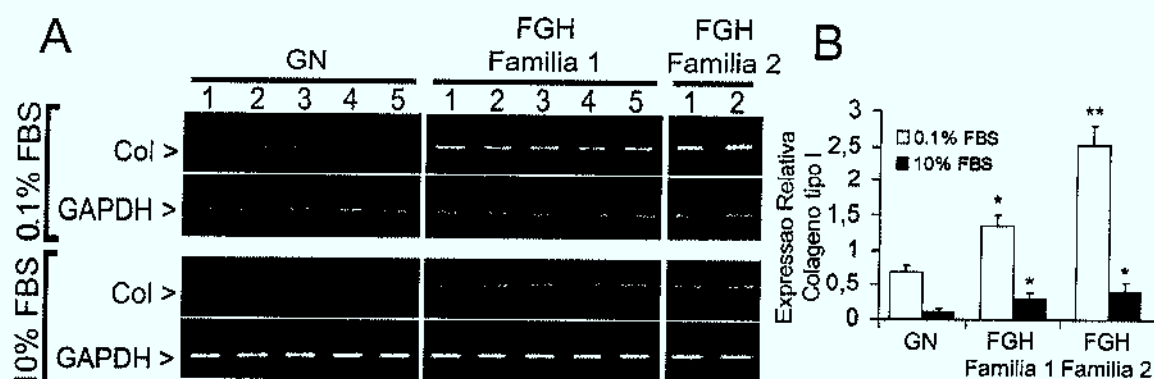


Figura 6. Expressão de colágeno tipo I em culturas de GN, FGH família 1 e FGH família 2. (A) Análise eletroforética em gel de agarose corado com brometo de etídeo e (B) análise densitométrica dos produtos de PCR para α -SMA normalizados para os níveis de GAPDH. A expressão de colágeno tipo I foi significativamente maior em culturas de FGH comparado com culturas de GN, na presença de 0,1 ou 10% soro fetal bovino. Células crescidas na concentração de 0,1% de soro fetal bovino, independente do tipo celular, expressaram maiores quantidades de colágeno tipo I mRNA que células crescidas à 10% de soro fetal bovino. * $p > 0,05$ e ** $p > 0,01$

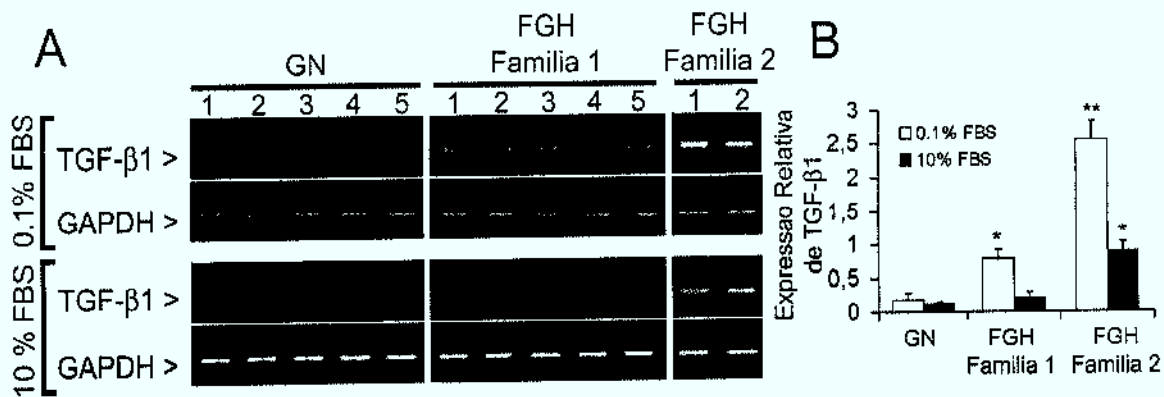


Figura 7. Expressão de TGFβ-1 é aumentada em culturas de FGH. (A) Análise eletroforética dos produtos de amplificação por RT-PCR para os genes TGF-β1 e GAPDH. (B) Análise densitométrica demonstrando a expressão relativa de TGF-β1 após normalização pelo produto de amplificação de GAPDH. A expressão de TGF-β1 foi significativamente maior nos grupos FGH família 1 e FGH família 2 comparado com as culturas do grupo controle quando as células foram crescidas em concentrações reduzidas de soro fetal bovino (0,1%), enquanto que na concentração de 10% de soro fetal bovino, a expressão de TGF-β1 foi significativamente maior apenas no grupo FGH família 2. * $p > 0,05$ e ** $p > 0,01$

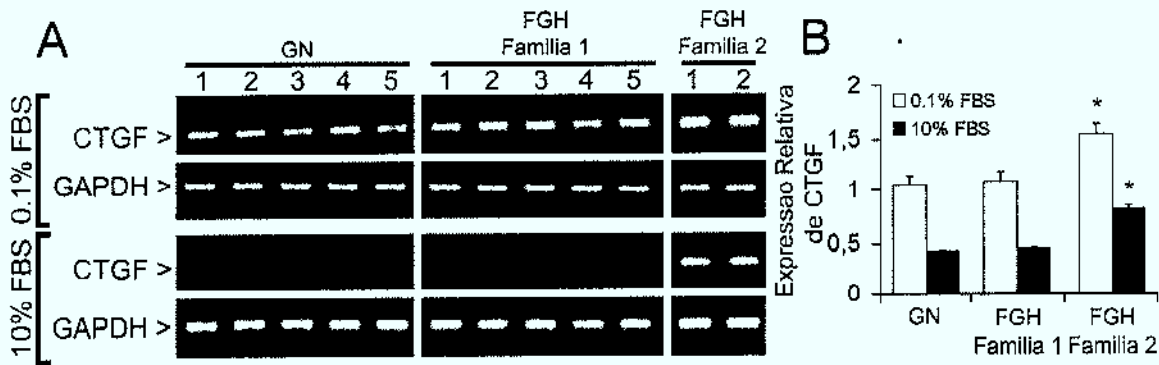


Figura 8. Expressão de CTGF mRNA é elevada em cultura celulares provenientes de pacientes com FGH pertencentes a família 2. (A) Análise por RT-PCR utilizando primers específicos para a amplificação de CTGF e GAPDH e (B) análise densitométrica. Note que a expressão de CTGF é significativamente maior no grupo FGH família 2 comparado com o grupo GN e grupo FGH família 1 nas concentrações de 0,1% e 10% de soro fetal bovino. * $p > 0,05$

Referências Bibliográficas

1. **Marquez, IM; Damante, JH; Rubo, ML; Chinellato, LEM.** Hereditary gingival fibromatosis : Review of literature and case report. *Rev Bras Odontol* 1992;69:12 –16.
2. **Goldblatt, J; Singer, SL.** Autosomal recessive gingival fibromatosis with distinctive facies. *Clin Genet* 1992;42:306-308.
3. **Kharbanda, P; Sidhu, SS; Panda, SK; Deshmukh, R.** Gingival fibromatosis: Study of three generations with consanguinity. *Quintessence Int* 1993;24:161-165.
4. **Singer, SL; Goldblatt, J; Hallam, LA.** Hereditary gingival fibromatosis with a recessive mode of inheritance. Case reports. *Aus Dent J* 1993;38:427-432.
5. **Clark, D.** Gingival fibromatosis. *J Can Dent Assoc* 1987;80:137-140.
6. **Bozzo, L; Almeida, OP; Scully, C; Aldred, MJ.** Hereditary Gingival Fibromatosis. Report of na extensive four-generation pedigree. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78:452-454.
7. **Gorlin, RJ; Cohen, MM; Levin, LS.** Syndromes of the head and neck, 3rd edn. New York. Oxford University Press 1990;847-858.
8. **Horning, GM; Fisher, JG; Barker, F; Killoy, WJ; Lowe, JW.** Gingival fibromatosis with hypertrichosis. *J Periodontol* 1985;56:344-347.
9. **Cuestas-Carnero, R; Bornancini, CA.** Hereditary generalized gingival fibromatosis associated with hypertrichosis: report of five cases in one family. *J Oral Maxillofac Surg* 1988;46:415-420.

10. **Araiche, M, Brode, H.** A case of fibromatosis gingivae. *Oral Surg* 1959;12:1307-1310.
11. **Ramon, Y; Berman, W; Bubis, JS.** Gingival fibromatosis combined with cherubism. *Oral Surg* 1967;24:435-448.
12. **Hartsfield, JK; Bixler, D; Hazen, RH.** Gingival fibromatosis combined with sensorineural hearing loss: an autosomal dominant trait. *Am J Med Genet* 1985;22:623-627.
13. **Nevin, NC; Scally, BG; Kernohan, DC, Dodge, JA.** Hereditary gingival fibromatosis. *J Ment Defic Res* 1971; 15:130-135.
14. **Skrinjaric, I; Bacic, M.** Hereditary gingival fibromatosis: report on three families and dermatoglyphic analysis. *J Periodont Res* 1989;24:303-309.
15. **Martelli-Junior H, Lemos DP, Silva CO, Graner E, Coletta RD.** Hereditary gingival fibromatosis: Report of a five-generation family with cellular proliferation analysis. *J Periodontol* 2005
16. **Coletta RD, Almeida OP, Graner E, Page RC, Bozzo L.** Differential proliferation of fibroblasts cultured from hereditary gingival fibromatosis and normal gingiva. *J Periodontal Res* 1998;33(8):469-75.
17. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-9
18. **Gabbiani G.** The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 2003;200(4):500-3
19. **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* 1999;40(4):237-49.

20.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* 1999;34(8):457-63.

21.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(3):296-306.

22.de Andrade CR, Cotrin P, Graner E, Almeida OP, Sauk JJ, Coletta RD. Transforming growth factor-beta1 autocrine stimulation regulates fibroblast proliferation in hereditary gingival fibromatosis. *J Periodontol* 2001;72(12):1726-33.

23.Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 2004;48(5-6):509-17.

24.Gabbiani G. Some historical and philosophical reflections on the myofibroblast concept. *Curr Top Pathol* 1999;93:1-5.

25.Desmouliere A, Gabbiani G. Myofibroblast differentiation during fibrosis. *Exp Nephrol* 1995;3(2):134-9.

26. **Faryniarz DA, Chaponnier C, Gabbiani G, Yannas IV, Spector M.** Myofibroblasts in the healing lapine medial collateral ligament: possible mechanisms of contraction. *J Orthop Res* 1996;14(2):228-37.
27. **Desmouliere A, Tuchweber B, Gabbiani G.** Role of the myofibroblast differentiation during liver fibrosis. *J Hepatol* 1995;22(2 Suppl):61-4
28. **Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G.** Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993;122(1):103-11.
29. **Phipps RP, Borrello MA, Blieden TM.** Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. *J Periodontal Res* 1997;32(1 Pt 2):159-65
30. **Bozzo L, Machado MA, de Almeida OP, Lopes MA, Coletta RD.** Hereditary gingival fibromatosis: report of three cases. *J Clin Pediatr Dent* 2000;25(1):41-6
31. **Chapman HA.** Disorders of lung matrix remodeling. *J Clin Invest* 2004;113(2):148-57
32. **Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S.** Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d793-807
33. **Akagi Y, Isaka Y, Arai M, Kaneko T, Takenaka M, Moriyama T, et al.** Inhibition of TGF-beta 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1996;50(1):148-55.
34. **Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T, Imai E.** Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth

factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest* 1993;92(6):2597-601.

35.Hocevar BA, Howe PH. Analysis of TGF-beta-mediated synthesis of extracellular matrix components. *Methods Mol Biol* 2000;142:55-65.

36.Cotrim P, de Andrade CR, Martelli-Junior H, Graner E, Sauk JJ, Coletta RD. Expression of matrix metalloproteinases in cyclosporin-treated gingival fibroblasts is regulated by transforming growth factor (TGF)-beta1 autocrine stimulation. *J Periodontol* 2002;73(11):1313-22.

37.Zhang C, Meng X, Zhu Z, Liu J, Deng A. Connective tissue growth factor regulates the key events in tubular epithelial to myofibroblast transition in vitro. *Cell Biol Int* 2004;28(12):863-73.

38.Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, et al. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *Faseb J* 1999;13(13):1774-86.

39.Yokoi H, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Nagae T, Makino H, et al. Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282(5):F933-42.

40.Yokoi H, Sugawara A, Mukoyama M, Mori K, Makino H, Suganami T, et al. Role of connective tissue growth factor in profibrotic action of transforming growth factor-beta: a potential target for preventing renal fibrosis. *Am J Kidney Dis* 2001;38(4 Suppl 1):S134-8.

41. **Grotendorst GR, Rahmanie H, Duncan MR.** Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *Faseb J* 2004;18(3):469-79.
42. **Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM.** Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* 2002;4(8):599-604.
43. **Uzel MI, Kantarci A, Hong HH, Uygur C, Sheff MC, Firatli E, et al.** Connective tissue growth factor in drug-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 2001;72(7):921-31
44. **Badid C, Mounier N, Costa AM, Desmouliere A.** Role of myofibroblasts during normal tissue repair and excessive scarring: interest of their assessment in nephropathies. *Histol Histopathol* 2000;15(1):269-80
45. **Gabbiani G.** Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept. *Cardiovasc Res* 1998;38(3):545-8
46. **Desmouliere A, Darby IA, Gabbiani G.** Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest* 2003;83(12):1689-707.
47. **Ahmed A, Huang L, Raftery AT, Ahmed AK, Fahmy H, El Nahas AM, et al.** Cyclosporine A sensitizes the kidney to tubulointerstitial fibrosis induced by renal warm ischemia. *Transplantation* 2004;77(5):686-92.
48. **Bisson MA, McGrouther DA, Mudera V, Grobbelaar AO.** The different characteristics of Dupuytren's disease fibroblasts derived from either nodule or cord: expression of alpha-smooth muscle actin and the response to stimulation by TGF-beta1. *J Hand Surg [Br]* 2003;28(4):351-6.

49. **Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G.** Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 2005;13(1):7-12
50. **Hinz B, Gabbiani G.** Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost* 2003;90(6):993-1002.
51. **Slattery C, Campbell E, McMorow T, Ryan MP.** Cyclosporine a-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition. *Am J Pathol* 2005;167(2):395-407.
52. **Rehan VK, Wang Y, Sugano S, Romero S, Chen X, Santos J, et al.** Mechanism of Nicotine-Induced Pulmonary Fibroblast Tmsdifferentiation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005.
53. **Grotendorst GR, Rahmanie H, Duncan MR.** Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *Faseb J* 2004;18(3):469-79.
54. **Grupp C, Troche I, Klass C, Kohler M, Muller GA.** A novel model to study renal myofibroblast formation in vitro. *Kidney Int* 2001;59(2):543-53.
55. **Zhang C, Meng X, Zhu Z, Liu J, Deng A.** Connective tissue growth factor regulates the key events in tubular epithelial to myofibroblast transition in vitro. *Cell Biol Int* 2004;28(12):863-73.
56. **Martelli-Junior H, Lemos DP, Silva CO, Graner E, Coletta RD.** Hereditary gingival fibromatosis: Report of a five-generation family with cellular proliferation analysis. *J Periodontol* 2005;76(12):2299-305.
57. **Araujo CS, 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 Periodontol Res*

- 58.. **Martelli-Junior H, Bolzani G, Graner E, Bozzo L, Coletta RD.** Microscopic and proliferative comparison of gingival fibroblasts from patients with normal gingiva and with hereditary gingival fibromatosis. *Pesq Odont Bras* 2000;
- 59.**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* 1999;40(4):237-49
- 60.**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(3):296-306.
- 61.**Bochaton-Piallat ML, Kapetanios AD, Donati G, Redard M, Gabbiani G, Pournaras CJ.** TGF-beta1, TGF-beta receptor II and ED-A fibronectin expression in myofibroblast of vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(8):2336-42.
- 62.**Günhan O, Gardner DG, Bostanci H, Günhan M.** Familial gingival fibromatosis with unusual histologic findings. *J Periodontol* 1995;66:1008–1011.
- 63.**Shirasuna K, Okur M, Watatani K, Hayashido Y, Saka M, Matsuya T.** Abnormal cellular property of fibroblasts from congenital gingival fibromatosis. *J Oral Pathol* 1989;7:381–385

- 64. Tipton DA, Dabbous MKh.** Autocrine transforming growth factor β stimulation of extracellular matrix production by fibroblasts from fibrotic human gingiva. *J Periodontol* 1998;**69**:609–619
- 65. Johnson L.L., Dyer R., Hupe, D.J.** Matrix metalloproteinases. *Curr Opin Chem Biol* 1998; 2:466–471