

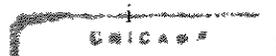
CLEVERTON ROBERTO DE ANDRADE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**ANÁLISE DO EFEITO AUTÓCRINO DO FATOR DE
CRESCIMENTO TRANSFORMANTE- β 1 NA
PROLIFERAÇÃO CELULAR DE FIBROBLASTOS
GENGIVAIS DE PACIENTES COM FIBROMATOSE
GENGIVAL HEREDITÁRIA**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção de
título de Mestre em Biologia e Patologia
Buco-Dental.

**PIRACICABA
2001**



CLEVERTON ROBERTO DE ANDRADE

**ANÁLISE DO EFEITO AUTÓCRINO DO FATOR DE
CRESCIMENTO TRANSFORMANTE- β 1 NA
PROLIFERAÇÃO CELULAR DE FIBROBLASTOS
GENGIVAIS DE PACIENTES COM FIBROMATOSE
GENGIVAL HEREDITÁRIA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em Biologia e Patologia Buco-Dental.

Orientador: **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**

Banca Examinadora:
Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga
Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida
Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPC-036/83
Assinatura do Orientador
10/1/2001

**PIRACICABA
2001**

Ficha Catalográfica

An24a Andrade, Cleverton Roberto de.
Análise do efeito autócrino do fator de crescimento transformante- β 1 na proliferação celular de fibroblastos gengivais de pacientes com fibromatose gengival hereditária. / Cleverton Roberto de Andrade. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2001.
xv, 115p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Ricardo Della Coletta.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Fibroblastos. 2. Gengivas. 3. Celulas – Crescimento. I. Della Coletta, Ricardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

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



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 01 de Março de 2001, considerou o candidato CLEVERTON ROBERTO DE ANDRADE aprovado.

1. Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

Handwritten signature of Ricardo Della Coletta in black ink, written over a horizontal line.

2. Prof. Dr. SILVIO SANCHES VEIGA

Handwritten signature of Silvio Sanches Veiga in black ink, written over a horizontal line.

3. Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA

Handwritten signature of Oslei Paes de Almeida in black ink, written over a horizontal line.

Dedico este trabalho à minha noiva
Flávia Regina Metzner, por sua
compreensão e colaboração constante.

E aos meus pais **Sebastião e Ester de
Andrade** pela dedicação e pelo amor
que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por patrocinar esta pesquisa (proc. 99/07933-3 e 99/08191-0).

Ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, por sua intensa colaboração e participação na realização desta obra, e pelos momentos de reflexão e auxílio nas situações adversas.

Ao Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida, pelo intenso aprendizado científico, pedagógico e psicológico.

Ao Prof. Dr. Pablo Augustin Vargas, por sua amizade e auxílio para o crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes, pelo incentivo inicial no ano de 1993.

À Ana Cristina do Amaral Godoy, pelo auxílio nas reações imuno-histoquímicas.

A Fábio Ramoa Píres, por sua sincera amizade e constante ajuda durante esses 2 anos de mestrado.

A Paulo Rogério Ferreti Bonan, por sua sincera amizade e momentos de descontração.

À Cristina Cunha Vilar, por sua sincera amizade.

À Renata Helena Bueno, por seu eterno carinho e amizade sincera.

Aos amigos e companheiros Paulo Rogério Faria e Danyel Elias da Cruz Perez.

A Halbert Villalba por sua imensa amizade e seu auxílio incondicional.

A Fábio de Abreu Alves por sua amizade e pelos momentos de descontração e felicidade em Carrancas.

A Matheus, pela amizade e companheirismo.

A Eduardo Fregnami pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos amigos do CPD, nas pessoas de Emílio e Totico pelo auxílio nas mais variadas questões.

Aos amigos e colegas do futebol pelos momentos de descontração.

À Cida (OROCENTRO) pela imensa ajuda durante os tratamentos clínicos.

Ao Rogério (OROCENTRO) pela colaboração nos procedimentos clínicos.

A Hercílio Martelli Júnior pela colaboração no trabalho.

A Cláudio Maranhão pela colaboração nos procedimentos clínicos.

"Hoje você é o mesmo que será daqui a cinco anos, exceto por duas coisas: as pessoas que você vier a conhecer e os livros que tiver lido."

Mac McMillan

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	1
LISTA DE ABREVIATURAS	3
1. RESUMO	5
2. ABSTRACT	7
3. INTRODUÇÃO	9
4. REVISÃO DA LITERATURA	13
4.1 Fibromatose gengival hereditária	13
4.2. Fator de crescimento TGF- β	21
4.3. Métodos de análise da proliferação celular	24
4.3.1. BrdU	25
4.3.2. PCNA	26
4.3.3. AgNOR	26
4.3.4. IM	28
5. PROPOSIÇÃO	29
6. MATERIAL E MÉTODOS	31
6.1. Pacientes	31
6.2. Cultura Primária	32
6.3. Subcultura	33
6.4 Ensaio de Incorporação de BrdU	34
6.5. Análise Imunohistoquímica de PCNA	35
6.6. Coloração de AgNOR	35
6.7. IM	36
6.8. Tratamento de fibroblastos de GN com TGF- β 1	36

6.9. Neutralização de TGF- β 1 usando oligonucleotídeos antisense	37
6.10. ELISA	38
6.11. Extração do RNA e análise por RT-PCR	39
6.12. Neutralização de TGF- β 1 usando anticorpos neutralizantes	40
6.13. Análise Estatística	40
7. RESULTADOS	41
7.1. Características clínicas e histológicas	41
7.2. Características morfológicas e velocidade de crescimento celular	45
7.3. Proliferação de fibroblastos de FGH	46
7.4. Efeito TGF- β 1 na proliferação de fibroblastos de GN	52
7.5. Efeito de oligonucleotídeos antisense na expressão e produção de TGF- β 1 por fibroblastos de FGH	54
7.6. Efeito de oligonucleotídeos antisense na proliferação de fibroblastos de FGH	55
7.7. Efeito de anticorpos neutralizantes contra TGF- β 1 na proliferação de fibroblastos de FGH	56
8. DISCUSSÃO	59
9. CONCLUSÃO	69
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
11. ANEXOS E APÊNDICES	85
11.1. Certificado do Comite de Ética	85
11.2. Cópia do trabalho enviado para publicação	86

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	Aspecto clínico de um dos pacientes com FGH deste estudo.	42
FIGURA 2 -	Aspecto histológico de gengiva obtida após gengivectomia/gengivoplastia do paciente da FIG.1.	43
FIGURA 3 -	Método de obtenção do tecido gengival normal através de biópsia com bisturi circular de 5mm.	44
FIGURA 4-	Características morfológicas dos fibroblastos de GN (A) e FGH (B) em cultura celular.	46
FIGURA 5 -	Fotomicroscopia de uma das linhagens de GN (A) e uma de FGH (B) coradas pela técnica de AgNOR. (100X)	48
FIGURA 6 -	Análise imunohistoquímica da incorporação de BrdU em GN (A) e FGH (B).	50
FIGURA 7 -	Análise da expressão de PCNA em fibroblastos de GN (A) e FGH (B).	51
FIGURA 8 -	Efeito de TGF- β 1 na expressão de PCNA (A) e na incorporação de BrdU (B) em linhagens celulares de GN.	53
FIGURA 9 -	Efeito do anticorpo anti-TGF- β 1 na expressão de PCNA (A) e na incorporação de BrdU (B) em duas linhagens celulares de FGH (FGH5 e FGH6).	57
TABELA 1 -	Características clínicas dos pacientes deste estudo.	32
TABELA 2 -	Análise quantitativa de AgNORs e IM em 12 linhagens celulares de GN e FGH.	47
TABELA 3 -	Análise imunohistoquímica da incorporação de BrdU e da expressão de PCNA em 12 linhagens celulares de GN e FGH.	52
TABELA 4 -	Análise imunohistoquímica em duas linhagens celulares de FGH tratadas com oligonucleotídeos antisense e sense na concentração de 10 μ M.	55
TABELA 5 -	Análise imunohistoquímica em duas linhagens celulares de FGH tratadas com oligonucleotídeo antisense e oligonucleotídeo antisense na presença de 1ng/ml de TGF- β 1.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

μ g - Micro grama

μ l - Micro litro

AgNOR - Região organizadora nucleolar arginofílica

Anti-BrdU - Anticorpo anti-BrdU

Anti-TGF β 1 - Anticorpo anti-TGF β 1

BrdU – Bromodeoxiuridina

BSA - Albumina de soro bovino

cDNA - DNA complementar

CT-SFB – Soro fetal bovino tratado com carvão ativado

DAB - 3'3-Diaminobenzidina tetrahidrocloreto

DMEM - Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO - Dimetil sulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetracético

ELISA – Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima

FGH - Fibromatose gengival hereditária

GN - Gengiva normal

HE - Hematoxilina e eosina

IdU - Iododesoxiuridina

IgG - Imunoglobulina G

IM - Índice mitótico

MEC - Matriz extracelular

ml - Mililitro

MMP - Metaloproteinase de matriz

nM - nano Molar

NOR - Região organizadora nucleolar

PBS – Salina em tampão fosfato

PCNA - Antígeno nuclear de proliferação celular

PCR - Reação da polimerase em cadeia

RNA - Ácido ribonucléico

RNA_m - RNA mensageiro

RNA_r - RNA ribossômico

RT-PCR - Transcriptase reversa-Reação da polimerase em cadeia

SFB - Soro fetal bovino

TGF- Fator de crescimento transformante

TIMP - Inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz

MAPKK – Proteína quinase mitogênica ativada

TAK1 – Fator de transcrição TAK1

1. RESUMO

FGH é uma condição oral rara caracterizada por um aumento gengival generalizado com crescimento lento e progressivo. 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 MMPs. TGF- β 1 é uma citocina com papel importante na patogênese de desordens fibróticas, incluindo FGH, devido a sua habilidade de estimular a síntese e reduzir a degradação de MEC. Embora tenha sido demonstrado que em FGH, TGF- β 1 em uma fração autócrina reduz os níveis de expressão e produção de MMPs, o papel desta citocina na modulação do crescimento celular não foi ainda estabelecido nesta doença. O objetivo deste estudo foi verificar o comportamento proliferativo de fibroblastos gengivais de 12 pacientes com FGH e determinar o papel do efeito autócrino de TGF- β 1 como um estimulador do crescimento celular, através de 2 métodos bem descritos na literatura: oligonucleotídeos antisense contra a região de tradução de TGF- β 1 e anticorpos neutralizantes. Quatro diferentes ensaios de análise de proliferação celular: incorporação de BrdU, expressão de PCNA, análise quantitativa de AgNORs e índice mitótico demonstraram que os índices de proliferação foram significativamente maiores em fibroblastos de FGH que em células controle. Oligonucleotídeos antisense reduziram a produção de TGF- β 1 como demonstrado por ELISA, enquanto que os níveis de expressão de RNAm para TGF- β 1 não foram alterados significativamente como revelado por RT-PCR. A redução na produção e atividade de TGF- β 1 acompa-

nhadas pelo tratamento com oligonucleotídeos e anticorpos neutralizantes, respectivamente, resultaram na redução na capacidade proliferativa de fibroblastos de FGH. Estes resultados indicam a existência de um papel autócrino de TGF- β 1 como um estimulador da proliferação celular de fibroblastos de FGH.

Palavras chave: Fibromatose gengival hereditária, fibroblastos, proliferação celular e fator de crescimento transformante β 1.

2. ABSTRACT

TGF- β 1 autocrine stimulation regulates fibroblast proliferation in hereditary gingival fibromatosis

Hereditary gingival fibromatosis (HGF) is a rare oral disease characterized by a slow and progressive enlargement of both the maxilla and mandible gingiva. Increased proliferation, elevated synthesis of extracellular matrix, particularly collagen, and reduced levels of matrix metalloproteinases seem to contribute to the pathogenesis of gingival overgrowth in HGF patients. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) is an important cytokine thought to play a major role in fibrotic disorders, such as HGF, due to its ability to stimulate the synthesis and reduce the degradation of extracellular matrix. In HGF fibroblasts, TGF- β 1 autocrine stimulation reduces expression and production of matrix metalloproteinases. However, the role of TGF- β 1 in the fibroblast growth modulation has not been established in this disease. The aim of this study was confirm the increased proliferation rate of HGF fibroblast cell lines and to explore a possible autocrine role of TGF- β 1 as a cell growth stimulator by blocking production of this endogenous cytokine using two well established systems: antisense oligonucleotides and neutralizing antibodies. Four different cellular proliferation assays: BrdU-labeling, AgNOR, PCNA and mitotic indexes confirmed that fibroblasts from HGF proliferate significantly faster than those from normal gingiva. Antisense oligonucleotides reduced TGF- β 1 production as demonstrated by capture ELISA, whereas mRNA TGF- β 1 statement levels were not significantly modified by using RT-PCR . Blocking TGF- β 1 synthe-

sis with oligonucleotides or its activity with specific antibodies resulted in a decreased magnitude of HGF fibroblast proliferation. These results are consistent with the existence of an autocrine role of TGF- β 1 as a stimulator of HGF fibroblast proliferation.

KEY WORDS: Hereditary gingival fibromatosis; fibroblast, proliferation index, transforming growth factor- β 1.

3. INTRODUÇÃO

FGH é uma condição oral rara clinicamente manifestada por um aumento gengival generalizado e fibrótico, podendo se apresentar de forma isolada ou associada a outras alterações, como parte de uma síndrome. Como tal, a FGH tem sido descrita em associação a hipertricose, retardo mental, epilepsia, perda auditiva progressiva e anormalidades das extremidades, particularmente dedos dos pés e mãos. A FGH geralmente apresenta um modo de herança autossômico dominante, contudo, o gene demonstra variáveis graus de penetrância e expressividade. Formas autossômicas recessivas são ocasionalmente relatadas. Histologicamente, a FGH é caracterizada por uma mucosa revestida por epitélio acantótico com longas e delgadas criptas epiteliais que se estendem ao tecido conjuntivo, denso e rico em fibras colágenas. Em adição ao colágeno, FGH e outras hiperplasias gengivais apresentam elevados níveis de outras macromoléculas da MEC como fibronectina e proteoglicanos.

Os mecanismos moleculares envolvidos na FGH são desconhecidos, e os resultados de estudos de culturas celulares variam. Evidências experimentais demonstraram que o aumento gengival pode estar relacionado com o metabolismo e/ou catabolismo de colágeno tipo I. Em culturas de células, Johnson et al. (1986) descreveram que fibroblastos gengivais de FGH são capazes de sintetizar as mesmas quantidades de proteínas quando comparados a fibroblastos de GN, mas a produção de colágeno é apenas a metade nas células de FGH. Estes autores também descreveram que a proliferação celular é menor em fibroblastos de FGH. Por outro lado, Shirasuna et al. (1989) demonstraram que apesar da capacidade

de produzir elevados níveis protéicos, incluindo colágeno, fibroblastos de FGH mostraram menor taxa de crescimento quando comparados com fibroblastos de GN. Desta forma, estes autores sugeriram que a hiperplasia gengival é resultado de uma produção e acúmulo excessivo de colágeno tipo I no meio extracelular. Oikarinen et al. (1990) estudando caso de FGH associado à deficiência na síntese de hormônios do crescimento, descreveram uma baixa taxa de proliferação celular, como descrito por Shirasuna et al. (1989), mas em contraste, o nível de produção de RNAm para colágeno tipos I e III foi menor nos fibroblastos de FGH. Sendo assim, estes autores sugeriram que o acúmulo de colágeno poderia ser decorrente de uma redução na atividade enzimática das colagenases, as principais enzimas extracelulares relacionadas com a degradação de colágeno tipo I, ou poderia ser decorrente de um aumento nos níveis extracelulares de TIMPs, os principais inibidores extracelulares do catabolismo do colágeno. Tipton et al. (1997) estudando três casos de FGH demonstraram uma maior velocidade proliferativa e uma maior produção de colágeno tipo I e fibronectina por fibroblastos de FGH. Embora tenha sido descrito que a excessiva produção de TGF- β controla a síntese de colágeno e fibronectina em FGH, o mecanismo responsável pelo acúmulo de colágeno ainda não foi compreendido (Tipton & Dabbous, 1998).

O Orocentro, Centro de Atendimento de Pacientes Especiais da Disciplina de Patologia Oral da FOP-UNICAMP, acompanha a mais de 20 anos uma família com FGH de padrão autossômico dominante. Após cinco gerações, esta família é constituída por 222 membros, dos quais 63 apresentam a alteração.

Como descrito, a FGH pode estar associada à outras alterações, porém, nossos pacientes não apresentam nenhuma das características comumente observadas em associação a FGH e apresentam intelecto normal (Bozzo et al., 1994). Recentemente, nós demonstramos, em um grupo de quatro linhagens celulares de fibroblastos isolados de pacientes com FGH, um maior índice proliferativo em fibroblastos de FGH quando comparados à fibroblastos de GN. Em condições de saturação celular, o número de fibroblastos de GN variou entre $2,5-3,2 \times 10^4$ células/cm², enquanto o número de FGH foi $4,0-4,7 \times 10^4$ células/cm² (Coletta et al., 1998).

TGF-β1 é um potente fator mitótico para fibroblastos, não apenas por induzir as células a entrarem na fase S, mas também por encurtar a fase G₁ do ciclo celular. Por outro lado, TGF-β1 inibe o crescimento celular de queratinócitos, células neuronais, linfócitos e hepatócitos, além de estimular a síntese de diversas proteínas da MEC como colágeno, fibronectina e proteoglicanos. TGF-β1 também inibe a degradação da MEC inibindo a síntese de MMPs e estimulando a síntese de TIMPs. TGF-β1 estimula o crescimento de vasos sanguíneos, processo chamado angiogênese. A expressão e produção de TGF-β1 têm recentemente sido amplamente analisada, *in vivo* e *in vitro*, em diversos modelos de fibrose decorrentes de processos inflamatórios ou senis. De forma geral, estes estudos demonstraram uma exacerbada expressão de TGF-β1 em associação com a progressão da fibrose. A indução de TGF-β1 no tratamento com ciclosporina parece

ser o principal fator relacionado com os efeitos colaterais da droga incluindo a hiperplasia gengival.

O objetivo deste trabalho foi confirmar a maior capacidade proliferativa de fibroblastos de FGH isolados de 12 membros de uma mesma família afetada por FGH e comparar com fibroblastos isolados de indivíduos com GN. Adicionalmente, analisar o papel da estimulação autócrino de TGF- β 1, que é produzido em grandes quantidades por fibroblastos de FGH, na estimulação de proliferação destas células utilizando dois modelos bem estabelecidos: oligonucleotídeos anti-sense contra a região de iniciação de tradução de TGF- β 1 e anticorpos neutralizantes. Também foi analisado o potencial de indução da proliferação celular de TGF- β 1 através de sua incorporação ao meio de cultura de linhagens de GN.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. Fibromatose gengival hereditária

Fibromatose gengival é um termo genérico usado clinicamente para identificar uma alteração volumétrica da gengiva, freqüentemente resultado do acúmulo de grandes quantidades de colágeno (Takagi et al., 1991). A fibromatose gengival é classificada em iatrogênica, idiopática, inflamatória, medicamentosa e hereditária. A fibromatose gengival de caráter hereditário é denominada FGH.

A FGH é uma condição oral rara que afeta 1 em 750.000 indivíduos (Ramer et al., 1996), clinicamente manifestada por um aumento gengival generalizado e fibrótico, podendo se apresentar na forma isolada ou associada a outras alterações, como parte de uma síndrome (Bozzo et al., 1994; Bakaeen & Scully, 1991). Como tal, a FGH foi descrita em associação a hipertelorismo (Wynne, 1995), hipertricose (Cuestas-Carneiro & Bornancini, 1988), retardo mental, epilepsia (Takagi et al., 1991), perda auditiva progressiva (Wynne, 1995) e anormalidades das extremidades, particularmente dedos das mãos e pés (Bakaeen & Scully, 1991).

A FGH é descrita clinicamente como um aumento gengival, firme, difuso, com pontilhado superficial característico, indolor, não hemorrágico e de coloração rosa, que dependendo da gravidade pode cobrir parcial ou totalmente os dentes (Bozzo et al., 2000). Este aumento gengival pode englobar ambos os arcos maxilares ou apenas porções localizadas de cada arco, sendo mais freqüente na superfície palatina da tuberosidade maxilar e na superfície lingual da mandíbula (Oikarinen et al., 1990). Quando localizado na tuberosidade maxilar pode esten-

der-se em direção ao palato duro e gerar compressão da língua (Günham et al., 1995). Casos mais graves, quando bilaterais, chegam a formar fendas ao centro, impedindo o correto posicionamento lingual (Wynne et al., 1995), interferindo na oclusão (Brown et al., 1995), dificultando a fonação e deglutição (Bozzo et al., 1994) ou até mesmo impedindo o contato labial (Kharbanda et al., 1993). Também foram descritos marcado espaço interdental e impactação de dentes decíduos (Singer, et al., 1993).

A FGH é transmitida de forma heterogênea, podendo manifestar de forma isolada ou mais raramente, como componente de uma síndrome. Frequentemente esta alteração é herdada de forma autossômica dominante, mas formas autossômicas recessivas também foram descritas (Gorlin et al., 1990; Goldblatt, 1992, Danesh-Meyer et al., 1993; Singer et al., 1993). A associação mais comum é com hipertricose, epilepsia e retardo mental (Singer et al., 1993). Dentre as principais síndromes associadas a FGH podemos destacar: síndrome Zimmerman-Laband (fibromatose gengival, displasia de nariz, orelhas e unhas, hipoplasia das falanges terminais, hiperextensividade das juntas e hepatoesplenomegalia), síndrome de Murray-Puretic-Drescher (fibromatose gengival associada a tumores fibro-hialinos de escalpe, nuca e lábios, osteólise das falanges terminais e infecções recorrentes), síndrome de Rutherford (fibromatose gengival, retardo na erupção dos dentes e opacidade da córnea), síndrome de Cowden (fibromatose gengival, fibroadenoma gigante de seios, hipertricose e múltiplos hamartomas), síndrome de Cross (fibromatose gengival, hipopigmentação, microftalmia com córneas turvas, retardo mental e paralisia cerebral), síndrome da fibromatose gengival (fi-

bromatose gengival, hipertricose, epilepsia e retardo mental), fibromatose gengival com surdez progressiva (fibromatose gengival, progressiva surdez sensorineural e fibroadenoma gigante dos seios). Algumas outras anomalias, tais como: surdez, hipertelorismo, telangiectasia, perda óssea alveolar, acromegalia, querubismo, estrabismo, catarata, tumores de tecido mole, ossos faciais aumentados, alergia, esplenomegalia e oligofrenia, anemia falciforme, baixa estatura, dentes supranumerários, sopro no coração, hipertensão e alergia a penicilina também foram descritas em associação a fibromatose gengival (Wynne et al., 1995, Ramon et al., 1967, Jorgenson & Cocker, 1974, Kratz & Morin, 1987, Brown et al., 1995).

É aceito que a FGH é uma alteração genética, mas o mecanismo pelo qual o aumento gengival ocorre ainda é desconhecido. O primeiro estudo sugerindo o provável gene alterado na FGH foi recentemente descrito por Hart et al. (1998). Estes autores, estudando uma família com 12 membros afetados por FGH através de técnicas de alinhamento genético, identificaram alterações provavelmente relacionadas com a doença no cromossomo 2 entre os loci D2S1788 e D2S441. Contudo, estudos semelhantes na nossa família não confirmaram alinhamento cromossômico similar (Hart et al, 2000) Recentemente, Xiao et al. (2000) analisando quatro diferentes famílias portadoras de FGH demonstraram que o provável gene relacionado a FGH esta localizado entre os loci D2S352 e D2S2163, que sobrepõe uma distância de 3.8 cM da região anteriormente descrita por Hart et al. (1998). A identificação do(s) gene(s) responsável(is) pelo aumento gengival observado em pacientes com FGH e o conhecimento da(s) mutação(ões) que provocam esta alteração, possibilitarão o conhecimento dos eventos biológi-

cos associados a esta alteração, abrindo perspectivas para a terapia definitiva destes pacientes.

Há consenso geral que o aumento gengival é proveniente de uma hiperplasia não inflamatória dos elementos do tecido conjuntivo. Densos e numerosos feixes de fibras colágenas mostram-se entrelaçados e permeados por fibroblastos, vasos sangüíneos e ocasionalmente, discreto infiltrado inflamatório. O epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado encontra-se hiperplásico e, profundas e delgadas criptas epiteliais projetam em direção ao conjuntivo subjacente (Redman et al., 1984; Danesh-Meyer & Holborow, 1993). Pequenos e múltiplos focos de calcificação distrófica, ilhas de metaplasia óssea, áreas de ulceração e focos de células inflamatórias também foram descritos (Günhan et al., 1995). Provavelmente, a grande variedade nas alterações histológicas descritas na FGH seja resultado da heterogeneidade clínica e genética da doença.

Os estudos ultraestruturais encontraram dois tipos principais de fibroblastos. Em áreas com densos feixes de fibras colágenas, encontra-se fibroblastos “inativos”, isto é, células com reduzido citoplasma, pequenos grupos de poliribossomos e escasso retículo endoplasmático e mitocôndrias. Em áreas repletas de MEC, os fibroblastos são maiores e considerados “ativos” por apresentarem amplas cisternas de retículo endoplasmático liso e rugoso, aparelho de Golgi bem desenvolvido e grande número de mitocôndrias e microfilamentos (Collan et al., 1982). Shirasuna et al. (1989) demonstraram em 2 irmãos afetados por FGH que os fibroblastos gengivais apresentavam um núcleo elíptico com um ou dois nucléolos e cromatina esparsa e, um citoplasma abundante em aparelho de Golgi, mito-

côndrias alongadas e retículo endoplasmático rugoso. Em análise ultraestrutural da MEC gengival de pacientes afetados por FGH, Barros (1991) descreve que as fibras colágenas exibiam um padrão de dissociação e uma grande variação de diâmetro. As fibras oxitalâmicas da gengiva de indivíduos com FGH comparando com a gengiva de pacientes normais apresentavam-se em maior quantidade. Por outro lado, não foi detectada a presença de fibras elásticas.

Os mecanismos biológicos envolvidos na FGH são desconhecidos, e os resultados de estudos de culturas celulares são controversos. Fibroblastos derivados da gengiva de pacientes com FGH demonstraram tanto redução quanto aumento no potencial proliferativo e na síntese de colágeno (Johnson et al., 1986; Shirasuna et al., 1989; Oikarinen et al., 1990; Tipton et al., 1997). Embora tenha sido demonstrado que o efeito autócrino de TGF β 1 regula a síntese de colágeno por fibroblastos de FGH (Tipton & Dabbous, 1998), os mecanismos relacionados à ativação desta citocina ainda são incertos. Em culturas de células, Johnson et al. (1986) descreveram que fibroblastos gengivais de FGH são capazes de sintetizar as mesmas quantidades de proteínas quando comparados a fibroblastos de GN, mas a produção de colágeno é apenas a metade nas células de FGH. Estes autores também descreveram que a proliferação celular é menor em fibroblastos de FGH. Shirasuna et al. (1989) demonstraram que apesar da capacidade de produzir elevados níveis protéicos, incluindo colágeno, fibroblastos de FGH mostraram menor taxa de crescimento quando comparado com fibroblastos de GN. Desta forma, sugeriram que a hiperplasia gengival é resultado de uma produção e acú-

mulo excessivo de colágeno tipo I no meio extracelular. Oikarinen et al. (1990) estudando um caso de FGH associado a deficiência na síntese de hormônios do crescimento, descreveram uma baixa taxa de proliferação celular, como descrito por Shirasuna et al. (1989), mas em contraste, o nível de produção de RNAm para colágeno tipos I e III foi menor nos fibroblastos de FGH. Tipton et al. (1997) estudando três casos de FGH demonstraram uma maior velocidade proliferativa e uma maior produção de colágeno tipo I e fibronectina por fibroblastos de FGH.

Nosso grupo tem cultivado fibroblastos isolados de pacientes com FGH desde 1997 e realizado estudos que versam desde a análise morfológica das células até a análise dos possíveis mecanismos biológicos que regulam o crescimento gengival observado em pacientes com FGH. Coletta et al. (1998) analisaram, através de seis diferentes ensaios de proliferação celular (ensaio de crescimento celular, ensaio colorimétrico de MTT, contagem e medida de NORs, determinação de expressão de PCNA e incorporação de BrdU e timidina tritiada), uma maior taxa de proliferação celular em fibroblastos isolados de 4 pacientes com FGH quando comparados com fibroblastos isolados de pacientes com GN. Análise por citometria de fluxo confirmou estes resultados, demonstrando que embora os fibroblastos de GN e FGH sejam diplóides, fibroblastos de FGH mostraram uma maior porcentagem de células nas fases S e G2/M do ciclo celular (Coletta et al., 1999a). Nossos resultados também demonstraram que fibroblastos de FGH são capazes de sintetizar maiores quantidades de colágeno comparado com fibroblastos de GN e, que, o colágeno tipo I produzido por estas células apresenta uma relação estequiométrica normal, caracterizada pela relação $[\alpha 1(1)]_2 [\alpha 2(1)]$ (Cole-

tta et al, 1999a). Estes resultados são consistentes aos dados da literatura que descreveram que os tipos de colágenos e as relações estequiométricas são as mesmas em gengivas normais e hiperplasias gengivais generalizadas induzidas por drogas ou de origem genética (Becker et al., 1967; Johnson et al., 1986).

Tradicionalmente é inferida a produção local de MEC como causa do aumento gengival de pacientes com FGH e em hiperplasias gengivais induzidas por drogas. Contudo, recentes estudos demonstraram igual importância para os mecanismos que regulam a proliferação celular e para degradação dos componentes da MEC. A degradação da MEC é principalmente realizada por enzimas do grupo das MMPs. As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco conhecidas pela sua habilidade de degradar várias macromoléculas da MEC. Inúmeras evidências existem para a participação das MMPs em processos normais e patológicos, incluindo embriogênese, reparação, inflamação, câncer e doenças fibróticas. A atividade catalítica das MMPs é regulada em múltiplos níveis, os quais incluem transcrição, tradução, secreção, ativação e inibição. Este último é controlado por membros da família dos inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz (TIMP). A expressão gênica é regulada por uma variedade de agentes, incluindo a citocina TGF- β 1. Em resposta a TGF- β 1, fibroblastos de FGH reduzem a produção de MMP-1, enquanto elevam os níveis de expressão e produção de MMP-2 (Cioletta et al., 1999b).

Recentemente, nós demonstramos que as células de FGH e GN, apesar da diferença de velocidade de crescimento, proliferaram em orientação para-

lela respeitando o espaço que deve normalmente existir entre as membranas celulares e, em condições de confluência celular não foi observado empilhamento, desorganização na distribuição ou morte celular. Morfologicamente em condições de subconfluência celular, os fibroblastos de FGH e GN foram similares. Exibiram formato fusiforme com núcleo central e típicos prolongamentos citoplasmáticos. Porém, em condições de confluência celular, os fibroblastos de FGH demonstraram tamanho e largura menores que fibroblastos de GN. A coloração das células pela técnica convencional de H&E e análise em microscopia de luz demonstrou que, a redução no volume celular dos fibroblastos de FGH em condições de confluência celular é resultado da redução no volume citoplasmático, não no volume nuclear (Martelli-Junior et al., 2000)

A FGH não pode ser curada, mas pode ser controlada com graus variados de sucesso. Quando o aumento gengival é mínimo, boa higiene dental pode ser a única medida a ser tomada para a manutenção das condições fisiológicas de mastigação, deglutição e fala e para a estética gengival dos pacientes. Com o aumento na quantidade de tecido gengival e início das alterações funcionais, é indicada a intervenção cirúrgica. Diversos autores têm observado recidiva do aumento gengival após gengivectomias e gengivoplastias, contudo, os benefícios fisiológicos e estéticos, mesmo que temporários, não devem ser subestimados. Cuestas-Carneiro & Bornancini (1988) e muitos outros autores recomendam a excisão do excesso de tecido gengival combinado com a extração de todos os dentes em casos crônicos, pois esta parece ser a única forma de tratamento definitivo. O tratamento dos pacientes acompanhado por nós recebe um protocolo muito mais con-

servador, isto é, gengivectomias e gengivoplastias com preservação da dentição. Esta opção é baseada na observação que após 30 anos de idade, o aumento gengival e as recidivas são menos intensas. Esta observação foi também descrita por Fletcher (1966). Vários métodos de remoção de grandes quantidades de tecido gengival têm sido utilizados em outros estudos como laser de dióxido de carbono (Bakaeen & Scully, 1991) e eletrocautério (Zackin & Weisberger, 1961). Emerson (1965) enfatizou a importância da obtenção de um correto contorno gengival como o ponto mais importante para a prevenção de recidivas. Adicionalmente, demonstra que o grau de hiperplasia gengival não parece estar associado com a higiene oral ou com a presença de tártaro.

4.2. Fator de crescimento TGF- β

Muitos eventos biológicos são regulados por interações celulares, que podem ser caracterizados em dois tipos: na membrana, isto é, entre membranas celulares; e interações mediadas por sinalizadores celulares, tal como citocinas (Albert et al., 1994). Citocinas são proteínas solúveis de pequena massa molecular produzidas por diferentes tipos celulares que apresentam a função de alterar o comportamento ou as propriedades celulares no local ou sistemicamente (Abbas et al., 1997). Incluem proteínas do grupo da citocinas: as interleucinas, os interferons, os fatores de crescimento, os fatores citotóxicos, os fatores inibidores ou ativadores e os fatores estimulantes de colônias. As citocinas apresentam funções importantes em inúmeros processos biológicos como proliferação, diferenciação, regeneração, inflamação e na resposta imunológica celular e humoral.

Como via de regra, a síntese das citocinas é induzida, embora tenha sido descrito que alguns fatores são produzidos de forma constitutiva. Após ativação, as células são capazes de produzir diferentes tipos de citocinas ao mesmo tempo. Muitas destas células também expressam receptores específicos de forma constitutiva ou induzida. As citocinas foram classificadas com base na sua origem e função, embora seja conhecido que muitas são geralmente moléculas multifuncionais e são produzidas por diversos tipos celulares. Citocinas foram originalmente identificadas e descritas em processos imunológicos e inflamatórios, e a grande maioria das publicações nesta área enfoca a participação destas proteínas nestes processos. Recentemente foi demonstrado que estas proteínas apresentam funções importantes em condições de homeostasia celular e que a expressão e produção desregulada pode estar relacionada com a etiologia de doenças.

TGF- β foi originalmente purificada de placenta humana, plaquetas e rim bovino (Hefti et al., 1993). A denominação TGF é devido à habilidade deste fator em permitir que células normais cresçam em "soft" ágar, uma característica exclusiva de células malignas (células transformadas), e por causar transformações fenotípicas em fibroblastos (Roberts et al., 1981; Tucker et al., 1983). TGF- β é uma família de moléculas formada por, pelo menos, cinco membros os quais são codificados por genes distintos e designados de TGF- β 1 a TGF- β 5. Estas moléculas são produzidas praticamente por todos os tipos celulares estudados até o momento e, podem produzir uma grande variedade de funções celulares, os quais são principalmente dependentes da célula alvo, entre outros fatores (Sporn et al., 1987). TGF- β é um potente fator mitótico para fibroblastos, não apenas por induzir

as células a entrarem na fase S, mas também por encurtar a fase G₁ do ciclo celular (Kim et al., 1998). Por outro lado, inibe o crescimento celular de queratinócitos, células endoteliais, células neuronais, linfócitos e hepatócitos, além de estimular a síntese de diversas proteínas da MEC como colágeno, fibronectina e proteoglicanos (Ignotz & Messague, 1986; Raghow et al., 1987). TGF- β também inibe a degradação da MEC inibindo a síntese de MMPs e estimulando a síntese de TIMPs (Laiho & Keski-Oja, 1989; Overall et al., 1989). TGF- β 1, 2 e 3 são as principais isoformas produzidas por células humanas; TGF- β 1 e TGF- β 2 são produzidas por muitos tipos celulares, enquanto que TGF- β 3 é principalmente expresso por células de origem mesenquimal (Massague, 1990). Estas moléculas são secretadas na forma latente como homodímeros e, devem ser ativados para desempenhar suas funções biológicas.

A expressão e produção de TGF- β 1 tem sido amplamente analisada, *in vivo* e *in vitro*, em diversos modelos de fibrose decorrentes de processos inflamatórios ou senis (Peters et al., 1998; Sibalic et al., 1998). De forma geral, estes estudos demonstraram uma exacerbada expressão de TGF- β 1 em associação com a progressão da fibrose. A indução de TGF- β 1 pelo tratamento com ciclosporina parece ser o principal fator relacionado com os efeitos colaterais da droga incluindo a hiperplasia gengival (Nicholson et al., 1998; Hojo et al., 1999). A utilização de fatores que impeçam a produção de TGF- β 1, ou a introdução de TGF- β 1 no meio de cultura contribui para a elucidação de seu papel em inúmeras doenças. A neutralização pode ser realizada através de anticorpos anti-TGF- β 1 (Imbert AM et al.,

1997) ou de oligonucleotídeos antisense contra a região de iniciação da tradução do RNAm (Defacque et al., 1999).

4.3. Métodos de análise da proliferação celular

O ciclo celular é dividido em fases distintas, sendo a fase M ou mitose, a etapa de divisão nuclear que lidera a formação de duas novas células. A fase M é a mais estudada. Contudo, a fase M, na maioria das células, tem uma duração de apenas 60 minutos, o que corresponde apenas a uma pequena fração do tempo total de duração do ciclo celular. O maior período do ciclo celular é ocupado pela fase denominada de interfase. A fase de interfase é dividida em 3 outras fases denominadas de G1, S e G2. A duplicação do DNA ocorre na fase S. O intervalo entre a mitose e o início da duplicação do DNA é chamada de fase G1 e o intervalo entre o final da duplicação do DNA e o início da divisão celular é chamado de fase G2. As fases G1 e G2 fornecem tempo para o crescimento celular.

Células na fase S do ciclo celular podem ser reconhecidas pela incorporação de nucleotídeos marcados no DNA. A marcação do DNA pode ser radioativa, comumente na forma de timidina tritiada, ou análogos moleculares, usualmente usado na forma de BrdU, que é análogo sintético da timidina. Os núcleos das células que incorporam o composto marcado são reconhecidos por autorradiografia ou por coloração com anticorpos anti-BrdU. Tipicamente, em uma população de células em crescimento quase todas as células estão proliferando, mas de uma maneira assíncrona, cerca de 30% estão na fase S e, portanto, são marcadas pela captação de precursor de DNA. Da fração de células marcadas (índice de

marcação), pode-se estimar a duração da fase S como uma fração do ciclo celular total. Além disso, pela adição de timidina tritiada ou BrdU e permitindo que as células continuem no ciclo durante períodos mensuráveis de tempo, pode-se calcular quanto tempo leva para uma célula na fase S do ciclo celular completar a formação de 2 novas células.. Pode-se também avaliar a taxa de proliferação através do IM, ou seja, a porcentagem de células que estão em mitose para um determinado número de células ou através de marcadores de proteínas reguladoras do ciclo celular (Schipper et al., 1998).

4.3.1. BrdU

Inicialmente, a análise da proliferação celular era realizada através da incorporação de nucleotídeos radioativos (timidina tritiada) com posterior identificação de células em divisão através de autorradiografias. Esta técnica apesar de muito eficiente, apresenta como desvantagens a necessidade de condições especiais de segurança e licença para trabalho com material radioativo. Entretanto, por muitos anos este foi o único meio de aferição da proliferação celular (Schipper, 1998). A análise da proliferação celular, incluindo dados sobre a duração das fases do ciclo, foi facilitada pela introdução de técnicas usando incorporação de BrdU ou IdU. BrdU e IdU são análogos moleculares da timidina sendo incorporados pelo núcleo durante a fase S do ciclo celular. Células em divisão contendo BrdU ou IdU são detectadas com anticorpos monoclonais através de imunohistoquímica ou citometria de fluxo (Gratzner, 1982). A reação com BrdU é realizada

mais facilmente e rapidamente que a marcação com timidina tritiada (Gratzner, 1982), e os resultados são semelhantes (Dover & Patel, 1994).

4.3.2. PCNA

PCNA é uma proteína nuclear de 36kDa que funciona como uma proteína auxiliar para a DNA polimerase δ e é absolutamente necessária na síntese de DNA (Schipper et al., 1998; Tsurimoto 1998). Ela é uma proteína nuclear reguladora do ciclo celular que é expressa diferentemente durante o ciclo, sendo sua taxa de síntese relacionada diretamente com as taxas de proliferação celulares. Os níveis de PCNA aumentam ao final da fase G_1 , imediatamente antes do início da síntese de DNA, se tornam máximos durante a fase S e declinam durante a fase G_2 , alcançando níveis basais na fase M e em células quiescentes. Um grande número de anticorpos monoclonais para PCNA está disponível atualmente no mercado, incluindo PC10, 19A2 e a9F4. (Schipper et al., 1998). O PCNA é um marcador imunohistoquímico útil para identificar células em proliferação devido a sua expressão e distribuição, correlacionadas com as taxas de síntese de DNA (Jaskulski et al., 1988)

4.3.3. AgNORs

Os NORs foram primeiramente descritos por Heitz (1931) e McClintock (1934) como regiões nucleolares da cromatina fortemente coradas ao fim da telofase e que desaparecem durante a mitose (Derenzini, 1998). Estas regiões correspondem as constrições secundárias dos cromossomos na metáfase de células

eucariontes, as quais, no homem estão localizadas nos braços curtos dos cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22. NORs contém genes ribossomais que transcrevem RNAr (Derenzini 1998; Lee et al., 1999). Proteínas ácidas altamente arginofílicas colocalizam com os NORs, devido este fato os NORs podem ser claramente visualizados pela coloração com nitrato de prata. Os NORs corados por prata são definidos como AgNORs (Derenzini, 1998; Trére, 2000). O método revela as regiões organizadoras dos cromossomos que estão ativas na interfase (Vandelaer et al., 1999). O número e o tamanho dos NORs na interfase são altamente variáveis no interior dos nucléolos, conforme a atividade transcricional do RNAr. Nucléolos com baixa atividade de biogênese de RNAr são caracterizados por um NOR interfásico grande e solitário, ao passo que nucléolo celular ativo exibe um grande número de pequenos NORs (Sirri, 2000; Derenzini, 1998). Então, a avaliação por análise da imagem do número e da área ocupada pelo NORs corado com prata dentro do nucleólo permite obter informação precisa da rotina funcional cito-histológica das amostras. A avaliação da distribuição quantitativa do AgNOR representa uma ferramenta única para obter informações sobre as taxas de proliferação. Muitas técnicas estão disponíveis para mensurar a porcentagem de células em proliferação (fração de crescimento), como por exemplo PCNA ou BrdU, mas nenhum deles dá informações da velocidade de proliferação (taxa proliferativa) (Derenzini, 1998).

Quanto à quantificação dos AgNORs, dois métodos são propostos: o método de contagem e o método morfométrico. O primeiro consiste na contagem do número de NORs e não leva em consideração sua dimensão, o segundo método utiliza medição automática ou semi-automática da área ocupada pelas estru-

ras coradas com prata dentro do núcleo utilizando computador de análise de imagem. Em relação ao método de contagem, o método morfométrico é mais preciso e mais objetivo, contudo, é mais lento. A única limitação prática é a necessidade de equipamentos adequados (câmara digital montada em microscópio óptico e ligados a um computador equipado com softwares específicos para análise morfométrica) e alguma familiaridade do pesquisador com computadores e estatística. Porém, convém lembrar que dos 1126 artigos publicados na literatura desde de 1987 a respeito da aplicação clínica do método de AgNOR em cito-histologia, somente 15,4% aplicaram análise morfométrica, enquanto que 84,6% utilizaram a contagem (Trére, 2000).

4.3.4. IM

A divisão celular é observável ao microscópio óptico no processo denominado mitose, durante o qual a célula-mãe se divide em duas, recebendo cada célula-filha um conjunto cromossômico igual ao da célula-mãe (Junqueira & Carneiro, 1998). Vários estudos utilizaram o índice mitótico como parâmetro proliferativo (Eckl & Raffelsberger, 1997; Othman, 2000). É importante distinguir o índice mitótico, que é a fração de mitoses expressa em percentagem, da contagem de número de mitoses que é realizada em 10 campos de grande aumento, usada como auxiliar no diagnóstico e prognóstico de patologias tumorais (Schipper et al., 1998).

5. PROPOSIÇÃO

1. Analisar e comparar a capacidade proliferativa de 12 linhagens celulares de fibroblastos de GN e FGH, utilizando 4 diferentes ensaios de proliferação celular: incorporação de BrdU, expressão de PCNA, análise quantitativa de AgNOR e índice mitótico.
2. Determinar o efeito de TGF- β 1 na proliferação de fibroblastos de GN.
3. Determinar o papel do efeito autócrino TGF- β 1 na proliferação celular de fibroblastos de FGH, utilizando 2 técnicas bem documentadas de neutralização: oligonucleotídeos antisense contra a porção inicial de tradução de TGF- β 1 e anticorpos neutralizantes contra TGF- β 1.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Pacientes

Fibroblastos gengivais foram obtidos de fragmentos gengivais de pacientes com GN e com FGH. O tecido gengival normal foi obtido através de biópsias com punch de 5mm à 2mm da margem gengival na região de gengiva inserida entre os dentes 13-14 de 12 voluntários que apresentaram gengiva clinicamente normal sem evidências de inflamação ou hiperplasia, e ausência de história de uso de medicamentos relacionados ao aumento gengival. A média de idade destes pacientes foi de $24,41 \pm 3,72$ anos e este grupo incluía 8 homens e 4 mulheres. As gengivas de 12 pacientes portadores de FGH foram coletadas durante tratamento cirúrgico de rotina no serviço de atendimento de pacientes especiais Orocetro/FOP-UNICAMP. Todos os pacientes com FGH são membros da mesma família, e apenas foram selecionados os indivíduos com aumento gengival generalizado de aspecto fibroso e sem sinais de inflamação. A média de idade deste grupo foi de $22,66 \pm 10,81$, sendo composto por 6 homens e 6 mulheres (TAB.1). Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas éticas de pesquisa envolvendo seres humanos - deliberação do Comitê de Ética em Pesquisa de Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

TABELA 1

Características clínicas dos pacientes deste estudo.

LINHAGEM CELULAR		SEXO	IDADE	LOCALIZAÇÃO	GRADUAÇÃO CLÍNICA*
GN	GN1	F	29	13-14	0
	GN2	M	25	13-14	0
	GN3	M	26	13-14	0
	GN4	M	26	13-14	0
	GN5	M	23	13-14	0
	GN6	F	19	13-14	0
	GN7	F	23	14-15	0
	GN8	M	22	13-14	0
	GN9	M	26	13-14	0
	GN10	F	18	13-14	0
	GN11	M	31	13-14	0
	GN12	M	25	13-14	0
FGH	FGH1	M	20	16-18	2
	FGH2	F	32	35	1
	FGH3	M	18	34-37	1
	FGH4	M	11	13-23	2
	FGH5	M	8	33-43	1
	FGH6	F	14	13-23	1
	FGH7	M	41	13-23	1
	FGH8	F	38	25	2
	FGH9	F	26	24	1
	FGH10	M	29	25-28	1
	FGH11	F	24	13-23	1
	FGH12	F	11	21-26	1

* Graduação clínica: (0) excelente condição gengival, sem sinais de inflamação ou hiperplasia gengival; (1) aumento gengival leve; (2) aumento gengival moderado; (3) aumento gengival agressivo (Machado, 1996).

6.2. Cultura Primária

O isolamento e estabelecimento dos fibroblastos gengivais foram realizados através da técnica de explante como descrito previamente (Coletta et al.,

1998). Resumidamente, fragmentos gengivais foram removidos e imersos em DMEM (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) acrescido de 10% soro fetal bovino (Cultilab Ltda, Campinas-SP), 125 mg/ml ampicilina G e 50 ng/ml anfotericina B à 4°C, lavados três vezes na mesma solução, cortados em fragmentos de aproximadamente 1 mm³ e transferidos para frascos de cultura de 25 cm², os quais foram mantidos à temperatura de 37°C e atmosfera úmida contendo 5% CO₂. O crescimento celular foi monitorado diariamente e o meio de cultura trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular. Após 15 dias a concentração de ampicilina G foi reduzida para 50mg/ml. Em todos os procedimentos de cultivo foram observados cuidados para a manutenção da assepsia e esterilidade.

6.3. Subcultura

Após atingirem a subconfluência, as células foram subcultivadas. No subcultivo, o meio de cultura foi removido e as células lavadas em solução de PBS pH 7,4 acrescido de 0,5 mM EDTA (Sigma). Em seguida, a adesão das células ao assoalho da garrafa de cultura foi rompida adicionando 1 ml de tripsina (Sigma) a 0,2%. A tripsina foi inativada com 10 ml de meio de cultura acrescido de 10% soro fetal bovino. A suspensão de células foi então centrifugada a 400g por 2 min, o sobrenadante descartado e as células então plaqueadas em garrafas de 25cm². Todas as linhagens celulares de FGH e de GN foram congeladas em nitrogênio líquido para uso posterior, utilizando meio de cultura acrescido de 25% soro fetal bovino e 10% DMSO (Sigma). Para o descongelamento das células, os criotubos foram imersos em banho de água à 37°C e as células transferidas para um tubo

contendo 10 ml de meio de cultura. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 5 ml de meio de cultura e colocadas em frascos de 25 cm². Todos os experimentos realizados neste estudo utilizaram células entre a terceira e décima passagens.

6.4. Ensaio de Incorporação de BrdU

Fibroblastos de GN e de FGH (30.000 células/well) foram plaqueados em lâminas de vidro de 8 wells (LabTek, Nalge Nunc Int, Naperville IL, USA) utilizando 500 μ l de meio DMEM acrescido de 10% soro fetal bovino por well e cultivados à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ por 24 h. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas no mesmo meio de cultura acrescido de BrdU (Amersham Life Sci Inc., Arlington IL, USA) na diluição de 1:1000. Após 1h de incorporação de BrdU, as células em proliferação foram reveladas através de análise imunohistoquímica utilizando protocolos descritos pelo fabricante (Kit de proliferação celular, Amersham Inc.). Resumidamente, após fixação em etanol 70%, as células foram lavadas em PBS e 500 μ l de uma solução aquosa de 4M HCl foi adicionada e mantida por 30 min para se obter a separação da dupla fita do DNA. Após a ação desnaturante da solução, as células foram lavadas três vezes com solução de PBS acrescida de 0,1% Tween 20 (Sigma), e incubadas por 30 min com solução de 3% BSA para inibir ligação inespecífica. O anticorpo monoclonal anti-BrdU conjugado à biotina foi então incubado na concentração de 1/200 durante 2h, seguido por incubação com estreptavidina-peroxidase por 1h. A

reação foi revelada com DAB em PBS acrescido de 0,05% H₂O₂. O índice de incorporação foi expresso como porcentagem de células marcadas com BrdU e representa a contagem de 1500 células de cada linhagem celular de fibroblastos de GN e FGH em três leituras de 500 células de diferentes passagens, utilizando o sistema de imagem Zeiss (KONTRON 400). A omissão de BrdU ou do anticorpo primário foi utilizado como controle negativo da reação.

6.5. Análise Imunohistoquímica de PCNA

Fibroblastos de GN e FGH foram plaqueados em lâminas de culturas de 8 wells (LabTek, Nalge Nunc Int, Naperville IL, USA) na concentração celular de 30.000 células/well, crescidos por 24 h e, em seguida, fixados em etanol 70%. Para prevenir ligação inespecífica, as células foram tratadas com 1% BSA por 1h previamente a exposição ao anticorpo monoclonal anti-PCNA (diluição 1:3.000, Dako Corp, Carpinteria CA, USA). A revelação foi realizada através do sistema de anticorpos ABC (Kit Duet-StrepABC Complex/HRP, Dako) e DAB. Os resultados foram expressos como porcentagem de células positivas através da contagem de 1500 células de cada linhagem de fibroblastos de GN e FGH em três leituras de 500 células em diferentes passagens, utilizando o sistema de imagem Zeiss.

6.6. Coloração de AgNOR

A técnica de AgNOR foi adaptada da original descrita por Chatterjee et al., (1997). Fibroblastos de GN e FGH foram plaqueados em lâminas de 8 wells (LabTek, Nalge Nunc Int, Naperville IL, USA) a uma densidade de 30.000 célu-

las/well e mantidas à 37°C, atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24h. Em seguida, as células foram lavadas com solução de PBS, fixadas em etanol 70%, por no mínimo 15 min, e reidratadas em soluções decrescentes de etanol. As células foram então incubadas por 30 min à 37°C em solução composta de 1 parte de 1% gelatina (Sigma) em 1% solução aquosa de ácido fórmico (Reagem, Rio de Janeiro-RJ) e 2 partes de solução aquosa de 50% nitrato de prata (Merck S.A., Rio de Janeiro-RJ). Os AgNORs foram visualizados em microscopia de luz e em cada linhagem celular o número de NORs foi determinado em 1500 células sendo três leituras de 500 células para diferentes passagens.

6.7. IM

Fibroblastos de FGH e GN plaqueados em lâminas de 8 wells e cultivados por 24 h em DMEM suplementado com 10% de SFB foram fixados em etanol 70% e corados com HE. O número de células em mitose foi determinado utilizando 60 campos aleatórios de 0.0256 mm² (aproximadamente 1,000 células em duas leituras de 500 células) para cada linhagem celular. O índice mitótico foi expresso como percentagem de células mitóticas por campo \pm desvio padrão.

6.8. Tratamento de fibroblastos de GN com TGF- β 1

Duas linhagens de fibroblastos de GN (GN5 e GN6) foram plaqueadas em lâminas de 8 wells (LabTek, Naige Nunc Int, Naperville IL, USA) a uma densidade de 30.000 células/well em 500 μ l de meio DMEM contendo 10% de SFB.

Após 16 h, as células foram lavadas com PBS e cultivadas em DMEM sem SFB por 24 h. Depois da supressão do soro, foi adicionado TGF- β 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 ng/ml em DMEM contendo 2,5% de SFB filtrado em carvão ativado. Transcorridas 24h, o índice proliferativo foi determinado como descrito acima.

6.9. Neutralização de TGF- β 1 usando oligonucleotídeos antisense

A neutralização de TGF- β 1 foi realizada por oligonucleotídeos antisense complementares à região inicial da tradução de TGF- β 1 RNAm como descrito por Le Roy et al (1998), com pequenas modificações. Resumidamente, fibroblastos gengivais de FGH2 e FGH5 foram plaqueados e crescidos à confluência de 80-90% em DMEM contendo 10% SFB. Previamente a transfecção, as células foram mantidas por 24h em DMEM sem SFB. Oligonucleotídeos dissolvidos em DMEM foram misturados com lipofectAMINE (Bio Rad) dissolvida em mesmo volume de meio e incubados por 45 min à temperatura ambiente. Transcorrido este período, complexos lipossomo-oligonucleotídeos foram diluídos em 8 volumes de meio de cultura, resultando em DMEM contendo 2,5% de SFB filtrado em carvão ativado, e adicionados às células. Em todos os experimentos, a concentração de oligonucleotídeos e de lipofectAMINE foi de 10 μ M e 1,25%, respectivamente. Fibroblastos crescidos na ausência de lipofectAMINE e com oligonucleotídeos sense acrescidos de lipofectAMINE foram utilizados como controle. Os oligonucleotídeos foram

antisense 5' GGA GGG CGG CAT GGG 3' e sense 5' CCC ATG CCG CCC TCC 3'. A eficiência da inibição de TGF- β 1 foi avaliada por ELISA e por RT-PCR.

6.10. ELISA

O ELISA de captura para determinar o nível de produção de TGF- β 1 utilizando o sobrenadante celular e anticorpo específico foi realizado como descrito a seguir. Placas de 96-wells contendo TGF- β RII foram incubadas com sobrenadante das culturas celulares (100 μ l) para cada well e mantidos por 2h à temperatura ambiente. Previamente a quantificação de TGF- β 1, TGF- β latente foi ativada pelo tratamento com 0,167M de HCl por 10 min seguido por neutralização com 1,2N NaOH em 0,5M de tampão HEPES. Após lavagem, adicionou-se os anticorpos primários e secundários anti-camundongo conjugados a biotina. A reação foi revelada pela adição de 200 μ l da mistura composta por 1 parte de avidina-peroxidase (Sigma) na concentração de 1:5.000 e 1 parte de 0,2 mg/ml de o-fenilenodiamina (Sigma) em 0,1M tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo 0,05% H₂O₂ (Sigma). A reação foi determinada pela adição de 2M de H₂SO₄ e a absorbância avaliada à 492nm utilizando um leitor de ELISA Ultramark (BioRad). Os níveis de produção das citocinas foram determinados por comparação da absorbância de padrões.

6.11. Extração do RNA e análise por RT-PCR

A expressão de TGF- β 1 em fibroblastos de FGH após o tratamento com oligonucleotídeos foi estimada por RT-PCR. Para este estudo, RNA celular total foi isolado pelo método de Chomczynski & Sacchi (1987) usando o kit Trizol[®] (GibcoBRL, Gaithersburg, MD). A concentração e pureza do RNA em cada amostra foi determinada usando espectrofotômetro Gênesys 2 (Spectronic Inst., Rochester, NY, USA). Dois microgramas do RNA total de cada amostra foi submetida a transcriptase reversa usando o kit "Superscript II Rnase H-reverse transcriptase" (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Os cDNAs resultantes foram então amplificados em uma mistura de 50 μ l contendo 1 μ M de cada primer (Kanto et al. 1997), 2mM MgCl₂, 0.8 mM dNTPs (GibcoBRL, Gaithersburg, MD), 0.0025 U/ μ l Taq DNA polimerase (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). β -actina foi usada como controle interno da reação. Primers para TGF- β 1 foram sense 5' AAG TGG ATC CAC GAG CCC AA 3' e antisense 5' GCT GCA CTT GCA GGA GCG CAC 3' e para β -actin sense 5' TCA GAA GGA CTC CTA TGT GG 3' e antisense 5' TCT CTT TGA TGT CAC GCA CG 3'. Após a desnaturação por 3 min à 93°C, 34 ciclos de amplificação foram realizados usando um termociclador modelo 9700 (Perkin Elmer, Foster, CA, USA), seguido pela extensão final por 10 min à 72°C. Os parâmetros dos ciclos foram: desnaturação por 30s à 94°C, anelamento por 1min à 55°C, extensão por 1min à 72°C. Após amplificação, 2 μ l do produto foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante a 5% e os produtos do PCR corados com prata como descrito por Sanguinetti et al. (1994).

6.12. Neutralização de TGF- β 1 usando anticorpos neutralizantes

Fibroblastos de FGH (FGH2 e FGH5) crescidos à 70% de confluência foram mantidos em DMEM livre de soro por 24 h, seguidos pela incubação com 2,5% SFB/DMEM tratado com carvão ativado contendo 0, 2.5 ou 5.0 μ g/ml de IgG de coelho anti-TGF- β 1 (AB-100-NA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) por um período adicional de 24 h. Após o tratamento, a análise proliferativa foi realizada como descrito anteriormente.

6.13. Análise Estatística

Para análise das diferenças dos grupos foi utilizado o teste não paramétrico de variância (ANOVA) baseado no teste de Kruskal-Wallis. As comparações múltiplas e o contraste ortogonal foram usados com o objetivo de detalhar os efeitos detectados no teste acima. A correlação entre os métodos de análise de proliferação celular foi verificada pelo coeficiente de correlação de Pearson com significância estabelecida em 5% ($P \leq 0,05$). Todos os ensaios foram realizados, pelo menos, 3 vezes em duplicatas ou triplicatas.

7. RESULTADOS

7.1. Características clínicas e histológicas

Clinicamente os pacientes com FGH apresentaram exacerbado aumento gengival de aspecto fibroso, crescimento lento e progressivo. Nos 12 casos analisados o aumento foi generalizado sendo a região anterior o sítio de maior agressividade (FIG.1). Os pacientes apresentaram dentes morfológicamente normais e não foram observadas quaisquer alterações radiográficas. Nenhum membro da família relatou ter feito uso de medicamentos relacionados ao aumento gengival e todos os membros que apresentaram FGH possuíam condições normais de saúde e inteligência dentro dos padrões normais.

Os exames histológicos dos tecidos gengivais removidos dos indivíduos com FGH apresentaram características típicas como tecido conjuntivo fibroso com densos e numerosos feixes de fibras colágenas, e no epitélio acantose e hiperplasia com projeções para o conjuntivo formando longas e delgadas criptas epiteliais, muitas vezes irregulares (FIG. 2). As características histológicas foram semelhantes para todos os pacientes do grupo.

Os pacientes com GN apresentaram a gengiva com características clínicas e histológicas de normalidade, sendo o tecido obtido através de biópsias com bisturi circular de 5mm dois a três milímetros acima da margem gengival livre, na maior parte das vezes, entre os dentes 13 e 14 (FIG. 3).



FIGURA 1 - Aspecto clínico de um dos pacientes com FGH deste estudo.

Note a generalizada hiperplasia gengival, afetando principalmente a região anterior.

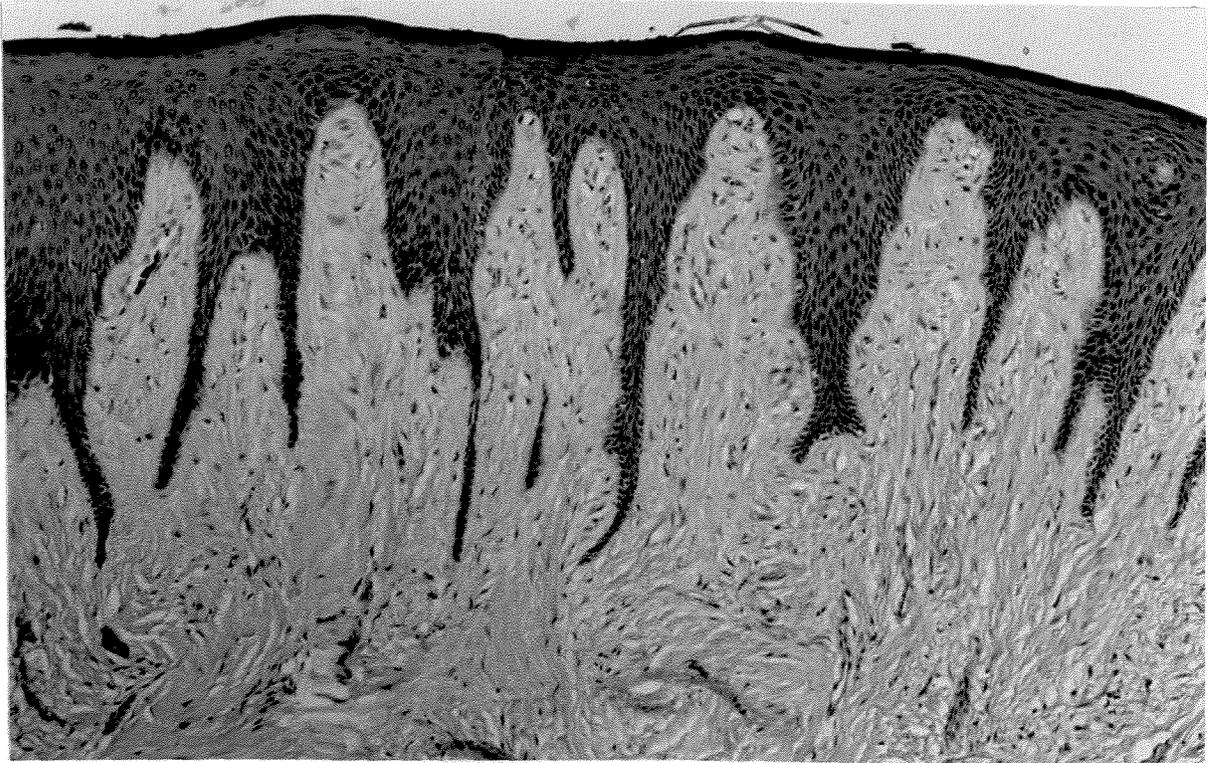


FIGURA 2 - Aspecto histológico de gengiva obtido após gengivectomia/gengivoplastia do paciente da FIG.1. O aumento gengival é proveniente de um acentuado acúmulo de feixes de fibras colágenas no tecido conjuntivo. O epitélio apresentou hiperplasia e profundas e delgadas criptas epiteliais projetam em direção ao conjuntivo subjacente (HE, X70).

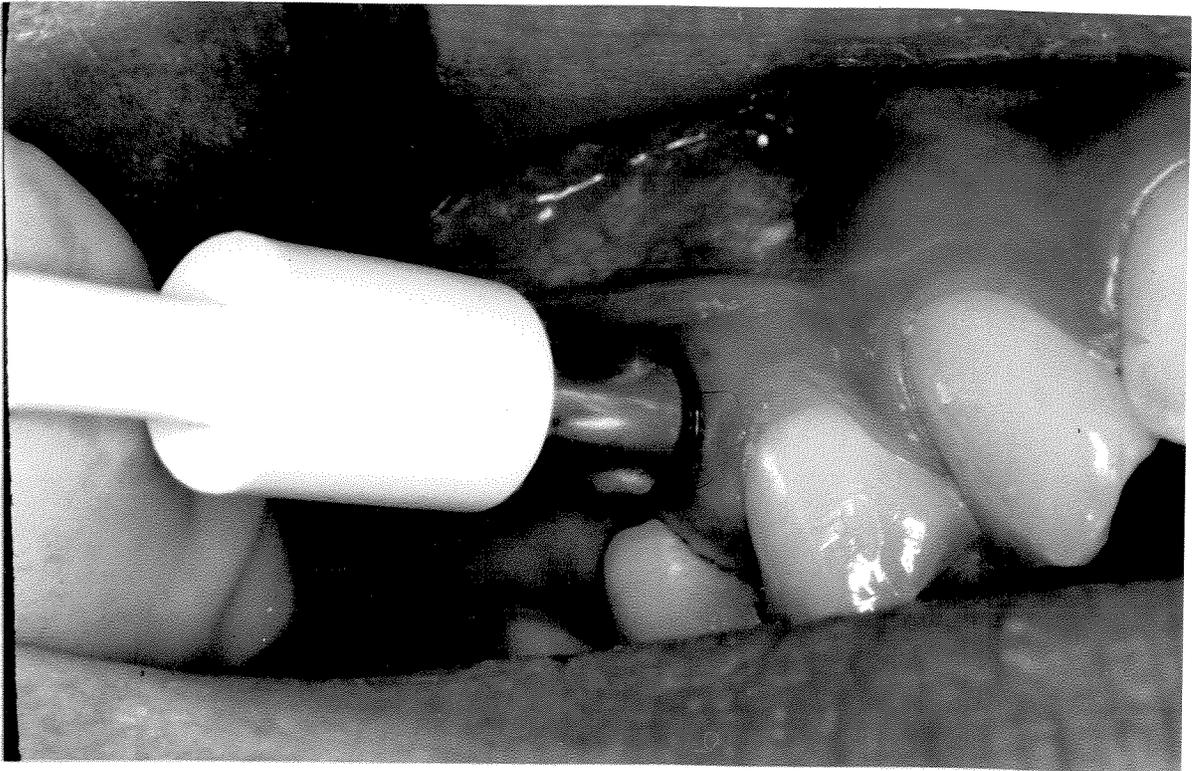


FIGURA 3 - Método de obtenção do tecido gengival normal através de biópsia com bisturi circular de 5mm. Note a coloração e o pontilhado superficial compatível com uma gengiva saudável.

7.2. Características morfológicas e velocidade de crescimento celular

Os tecidos coletados foram encaminhados para o laboratório de cultura de células e exame histopatológico. No laboratório de cultura de células os tecidos foram submetidos a técnica de explante. Neste momento foi possível verificar que os fibroblastos de FGH apresentavam velocidade de crescimento maior que os fibroblastos da GN. Fibroblastos gengivais foram observados emergindo de todos os fragmentos, sendo em FGH após 20 dias, e em GN após 27 dias do plaqueamento (em média). Após 35 a 37 dias de cultura primária, mais de 90% dos frascos apresentam-se preenchidos com fibroblastos de FGH, realizando-se então a primeira subcultura. Por outro lado, a primeira subcultura de GN ocorreu após 42 a 45 dias de seu plaqueamento. As características morfológicas dos fibroblastos de GN e FGH foram semelhantes. As células exibiram formato fusiforme com núcleo central e típicos prolongamentos citoplasmáticos (FIG. 4). As células de GN e FGH proliferaram em orientação paralela respeitando o espaço normalmente encontrado entre as membranas celulares e, em condições de confluência celular não foi observado empilhamento, desorganização ou morte celular.

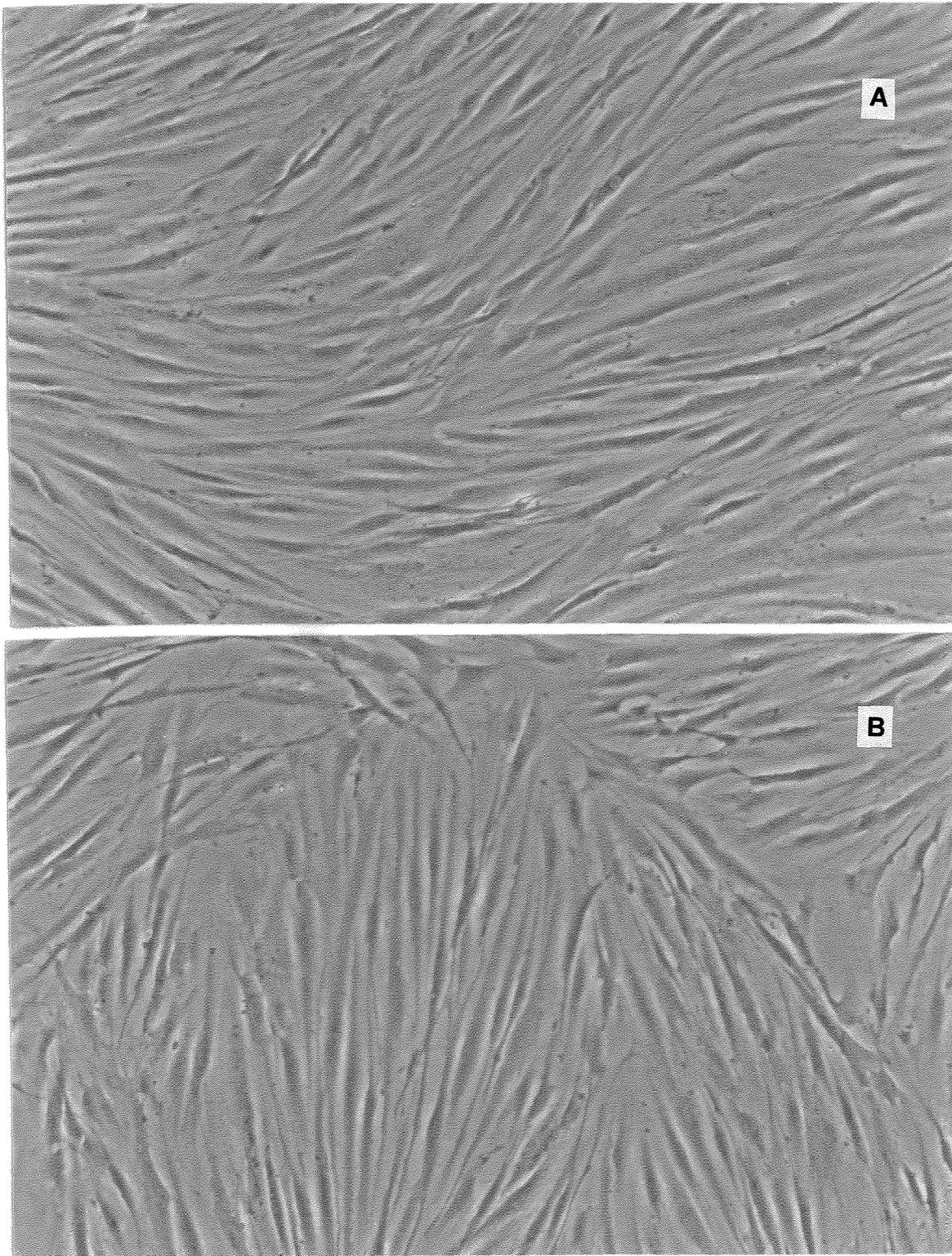


FIGURA 4 - Características morfológicas dos fibroblastos de GN (A) e FGH (B) em cultura celular. Observe o típico formato fusiforme com núcleo central das células (X100).

7.3. Proliferação de fibroblastos de FGH

As taxas de proliferação dos fibroblastos de FGH e GN foram avaliadas medindo a incorporação de BrdU no DNA, a expressão imunohistoquímica de PCNA e quantificando o número de AgNORs, além de determinar o IM. O número médio de AgNORs por núcleo é descrito na TABELA 2. Em todas as linhagens celulares foi possível evidenciar os NORs no interior do núcleo das células, os quais foram claramente visualizados como pontos negros (FIG.5). A diferença entre as contagens médias entre os grupos de fibroblastos foi significativa ($p < 0,05$). O IM medido pela contagem direta demonstrou uma porcentagem significativamente maior de células em mitose no grupo de FGH quando comparada com o grupo controle (TAB. 2; $p < 0,001$).

TABELA 2
Análise quantitativa de AgNORs e IM em 12 linhagens celulares de GN e FGH. Os dados representam a média \pm desvio padrão de 1.500 células para cada linhagem celular.

	Número NORs/Núcleo	Porcentagem mitoses/campo
GN	3.146 \pm 0,430	1,85 \pm 0,931
FGH	3.318 \pm 0,272*	3,21 \pm 0,763**

* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

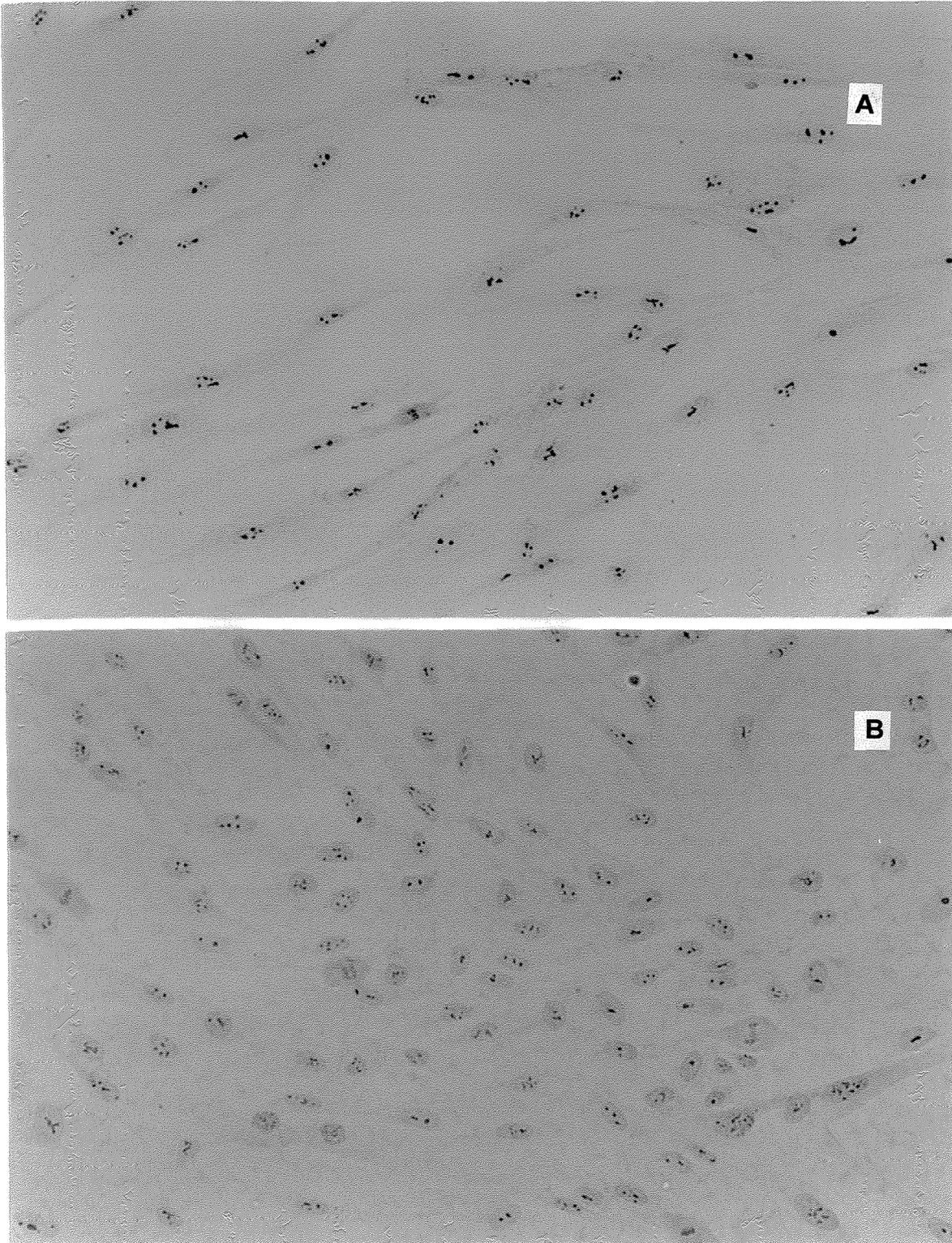


FIGURA 5 - Fotomicroscopia de uma das linhagens de GN (A) e uma de FGH (B) corados pela técnica de AgNOR (X160).

As reações imunohistoquímicas para BrdU e PCNA foram clara e facilmente identificadas em ambos os grupos (FIG. 6 e 7). Núcleos com coloração amarronzada, independente da intensidade, foram interpretados como positivo. A TAB. 3 mostra que fibroblastos de FGH apresentaram um índice de incorporação de BrdU significativamente maior que fibroblastos de GN($P < 0,001$). Todas as linhagens de FGH mostraram taxa proliferativa maior que as linhagens de fibroblastos de GN, com exceção de GN3 que demonstrou um índice de incorporação de BrdU maior que a média do grupo de FGH. A porcentagem de células positivas para BrdU no grupo de FGH variou entre 18 e 36%, com mediana de 26% (média $26,09\% \pm 4,70$), enquanto que no grupo de GN a taxa variou entre 7 e 32%, com mediana de 13% (média $14,31\% \pm 7,56$). Os índices de marcação para PCNA variaram entre 15 e 39% com mediana em 28% para o grupo de FGH (média $25,91\% \pm 8,87$) e entre 13 e 35% com mediana em 17% para o grupo GN (média $18,01\% \pm 10,35$) (TAB. 3). Os índices de expressão de PCNA em fibroblastos de FGH foram significativamente maiores aos do grupo controle ($p < 0,01$). Existiu uma positiva e significativa correlação entre o índice de incorporação de BrdU e todos os outros métodos de análise de proliferação celular usados neste estudo, sendo o coeficiente de correlação com AgNOR igual a $r = 0,502$, com PCNA igual a $r = 0,481$ e com IM igual a $r = 0,557$. A correlação entre PCNA e AgNOR ($r = 0,569$) também foi significativa.

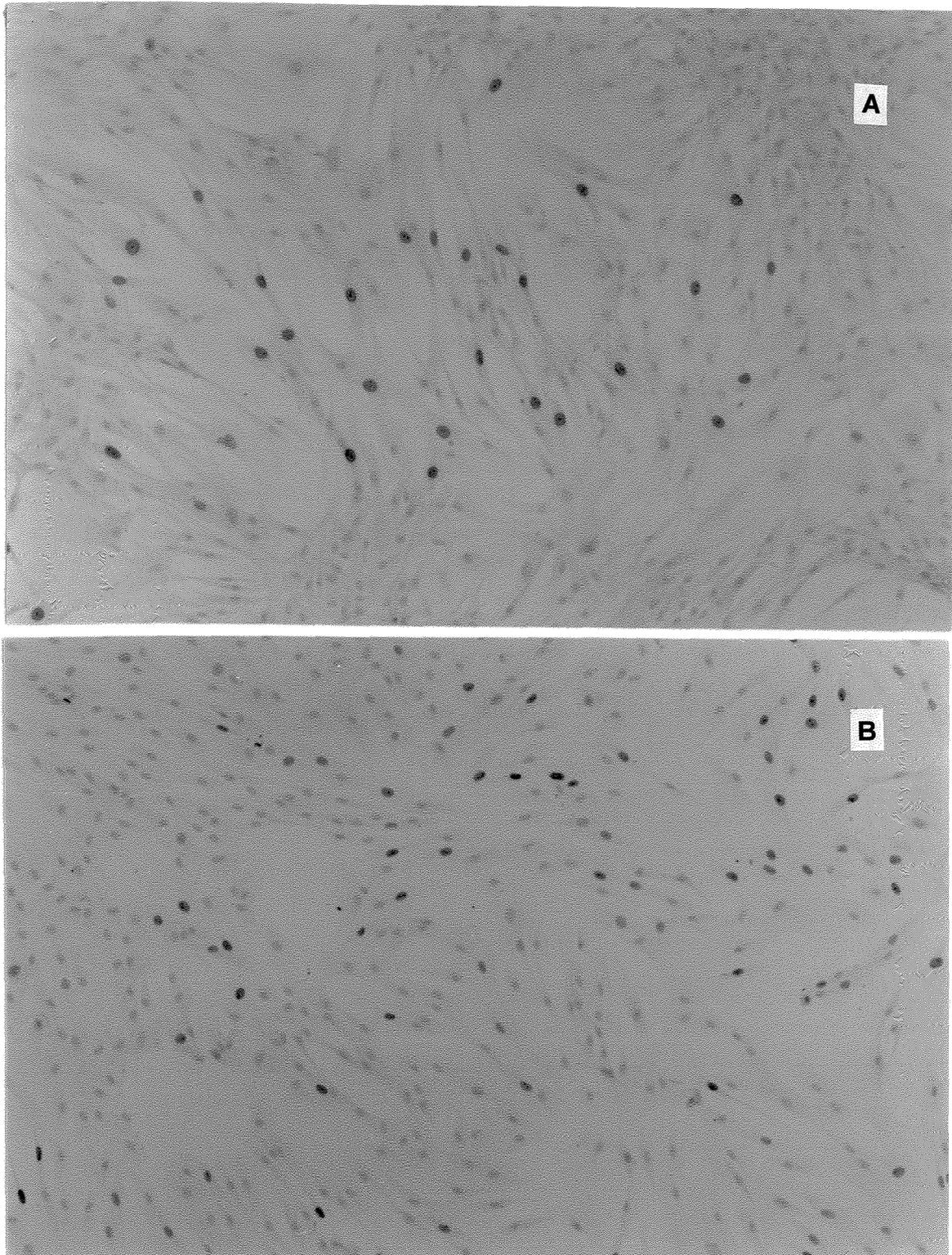


FIGURA 6 - Análise imunohistoquímica da incorporação de BrdU de GN (A) e FGH (B). Após incorporação, o DNA foi desnaturado e o antígeno detectado pela técnica de biotina-avidina-peroxidase (ABC) (X70).

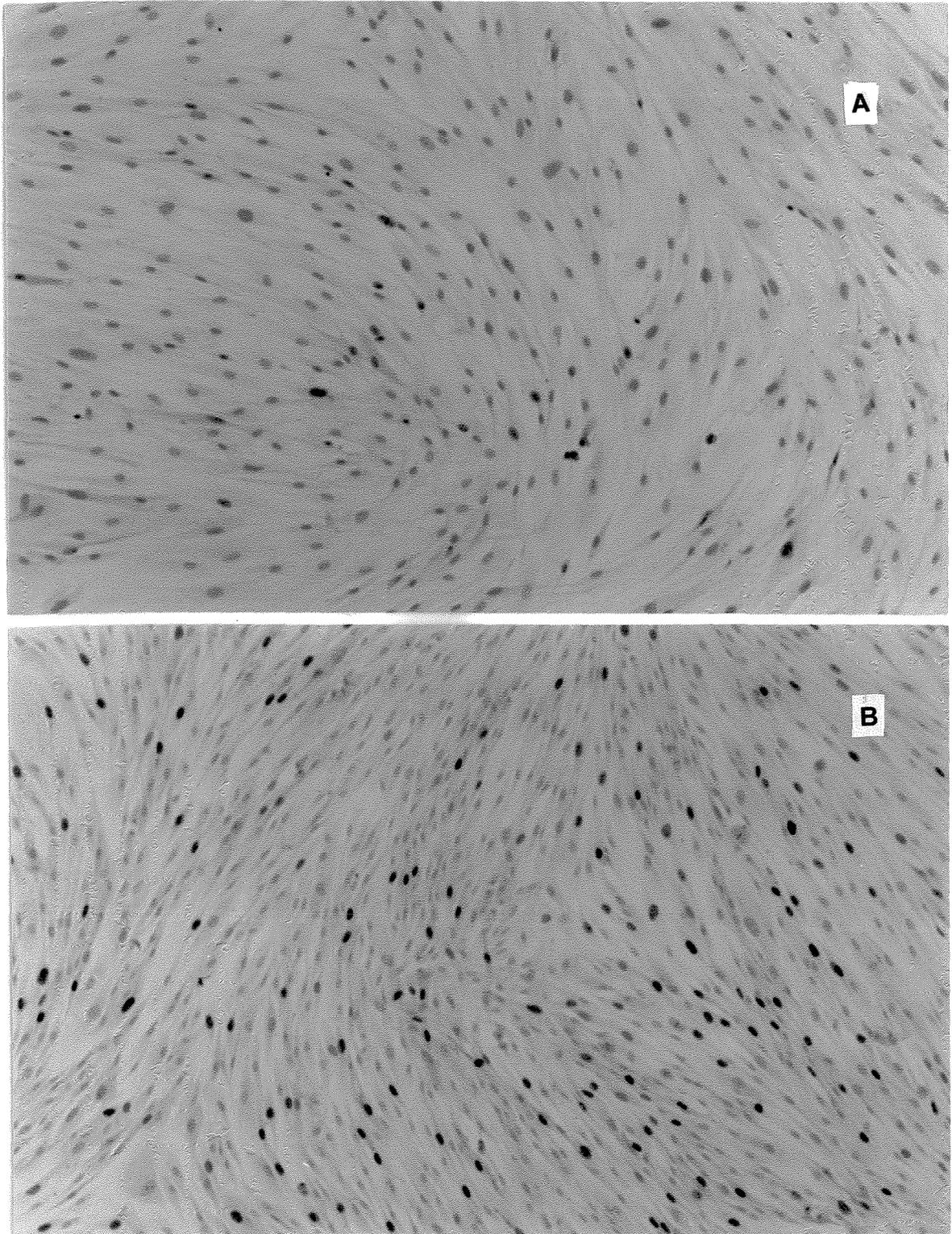


FIGURA 7 - Análise da expressão de PCNA em fibroblastos de GN (A) e FGH (B). Observe a maior incidência de células positivas na cultura celular de FGH quando comparado com a cultura de GN (X70).

TABELA 3

Análise imunohistoquímica da incorporação de BrdU e da expressão de PCNA em 12 linhagens celulares de GN e FGH. Os dados representam a média \pm desvio padrão de 1500 células (três lâminas independentes).

	BrdU(%)	PCNA(%)
GN	14,309 \pm 7,567	18,010 \pm 10,353
FGH	26,085 \pm 4,702*	25,910 \pm 8,872**

* p<0,001 ** p<0,01

7.4. Efeito TGF- β 1 na proliferação de fibroblastos de GN

Para avaliar o efeito de TGF- β 1 sobre a proliferação celular de fibroblastos de GN, duas linhagens celulares foram selecionadas aleatoriamente e incubadas por 24 h na presença de concentrações crescentes de TGF- β 1 diluídas em DMEM suplementado com 2,5% de CT-SFB. A FIG. 8 ilustra o efeito de TGF- β 1 (variando entre 0,1-10 ng/ml) na incorporação de BrdU (B) e expressão de PCNA (A). Todas as três concentrações de TGF- β 1 (0,1; 1,0 e 10 ng/ml) produziram aumento nos índices de proliferação em relação ao controle. A resposta a TGF- β 1 para 0,1 ng/ml foi estatisticamente significativa (P<0,05) em relação ao grupo controle.

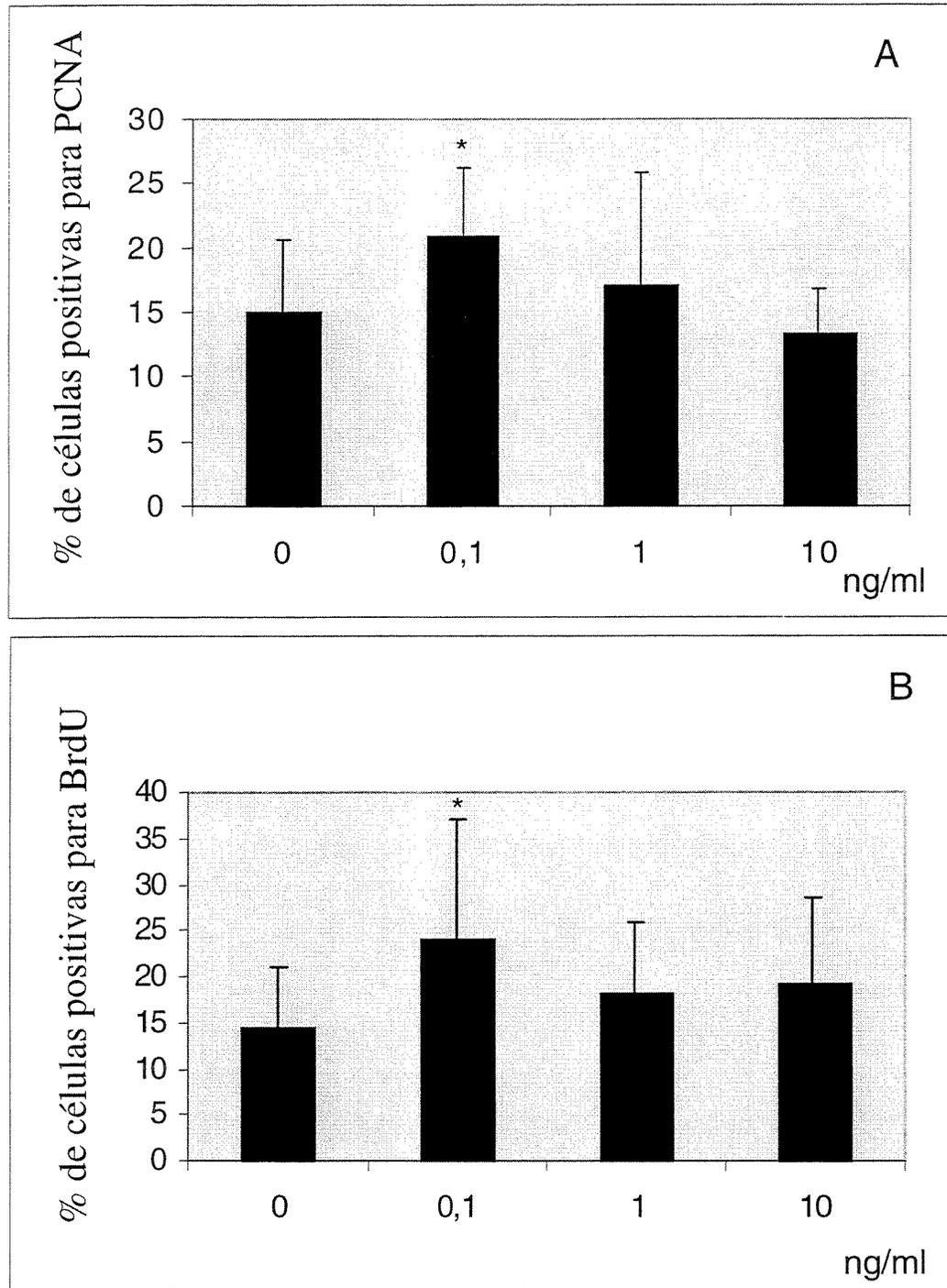


FIGURA 8 - Efeito de TGF- β 1 na expressão de PCNA (A) e na incorporação de BrdU (B) em linhagens celulares de GN. Fibroblastos de GN (linhagens GN5 e GN6) foram cultivados na presença de 0,1; 1,0 ou 10 ng/ml de TGF- β 1 por 24h. Os valores representam a média \pm desvio padrão das duas linhagens. * $p < 0,05$

7.5. Efeito de oligonucleotídeos antisense na expressão e produção de TGF- β 1 por fibroblastos de FGH

Considerando que TGF- β 1 estimula a proliferação de fibroblastos de GN, nós buscamos determinar se o papel autócrino desta citocina, que é produzida em grandes quantidades por fibroblastos de FGH₁, poderia mediar o comportamento proliferativo destas células. Para determinar a eficácia de oligonucleotídeos antisense na neutralização da produção de TGF- β 1, nós determinamos a concentração de TGF- β 1 secretada no sobrenadante de duas linhagens celulares de FGH em cultura (FGH2 e FGH5) por ELISA. Estes estudos revelaram uma redução de 38% na produção de TGF- β 1 por células cultivadas na presença de oligonucleotídeos antisense quando comparados com oligonucleotídeos sense. Resultados semelhantes foram obtidos por Le Roy et al. (1998) usando células semelhantes à fibroblastos isolados de tecido intersticial de testículo. Para confirmar que oligonucleotídeos antisense alteraram a produção de TGF- β 1 e não a expressão, nós estudamos os níveis de TGF- β 1 RNAm usando RT-PCR. Tanto oligonucleotídeos antisense quanto sense não modificaram os níveis de expressão de TGF- β 1. Estes resultados confirmam a especificidade dos oligonucleotídeos antisense e reafirmam sua capacidade de bloquear a produção TGF- β 1 em fibroblastos de FGH.

7.6. Efeito de oligonucleotídeos antisense na proliferação de fibroblastos de FGH

Os dados da incorporação de BrdU e índice de PCNA após o tratamento das células com oligonucleotídeos são mostrados na TAB. 4. Os valores de incorporação de BrdU e o índice de PCNA em fibroblastos de FGH tratados com oligonucleotídeos antisense foram significativamente menores que em células tratadas com oligonucleotídeos sense ($P < 0,001$).

TABELA 4

Análise imunohistoquímica em duas linhagens celulares de FGH tratadas com oligonucleotídeos antisense e sense na concentração de 1 μ g/ml. Os dados representam a média \pm desvio padrão de 1.500 células (três lâminas independentes) em BrdU e PCNA.

	BrdU(%)	PCNA(%)
Sense	14,571 \pm 6,601	8,991 \pm 3,883
Antisense	8,848 \pm 0,876*	3,402 \pm 1,337*

* $p < 0,001$

Para confirmar a especificidade de oligonucleotídeos antisense, nós examinamos se a adição de TGF- β 1 poderia reverter os efeitos do tratamento com oligonucleotídeo antisense. Nós verificamos que 0,1 ng/ml de TGF- β 1 foi capaz de reverter parcialmente os efeitos do oligonucleotídeo antisense sobre a proliferação de FGH (TAB. 5).

TABELA 5

Análise imunohistoquímica em duas linhagens celulares de FGH tratadas com oligonucleotídeo antisense e oligonucleotídeo antisense na presença de 0,1ng/ml de TGF- β 1. Os dados representam a média \pm desvio padrão de 1.500 células (três lâminas independentes) para BrdU e PCNA.

	BrdU(%)	PCNA(%)
Controle	34,566 \pm 15,316	47,999 \pm 19,900
Oligonucleotídeo antisense	24,442 \pm 14,476	33,228 \pm 18,089
Antisense + 0,1ng/ml TGF-β1	23,652 \pm 14,218	38,916 \pm 20,177

7.7. Efeito de anticorpos neutralizantes contra TGF- β 1 na proliferação de fibroblastos de FGH

O efeito de TGF- β 1 sobre a proliferação celular em fibroblastos de FGH foi confirmado com anticorpos anti-TGF- β 1. Embora tenha sido anteriormente demonstrado que 5 μ g/ml de anticorpo anti-TGF- β 1 anularam o efeito de 500 μ g de TGF- β 1 (Imbert et al., 1998; Defacque et al., 1999), nós verificamos que 5 μ g/ml de anti-TGF- β 1 foi suficiente para neutralizar 100% de TGF- β 1 produzido por 1×10^6 fibroblastos de FGH2 e FGH5 em 24 h. Com base nestes resultados, várias concentrações de anticorpo anti-TGF- β 1 foram adicionadas ao meio contendo fibroblasto de FGH, os quais produziram sensível diminuição na taxa proliferativa (FIG. 9).

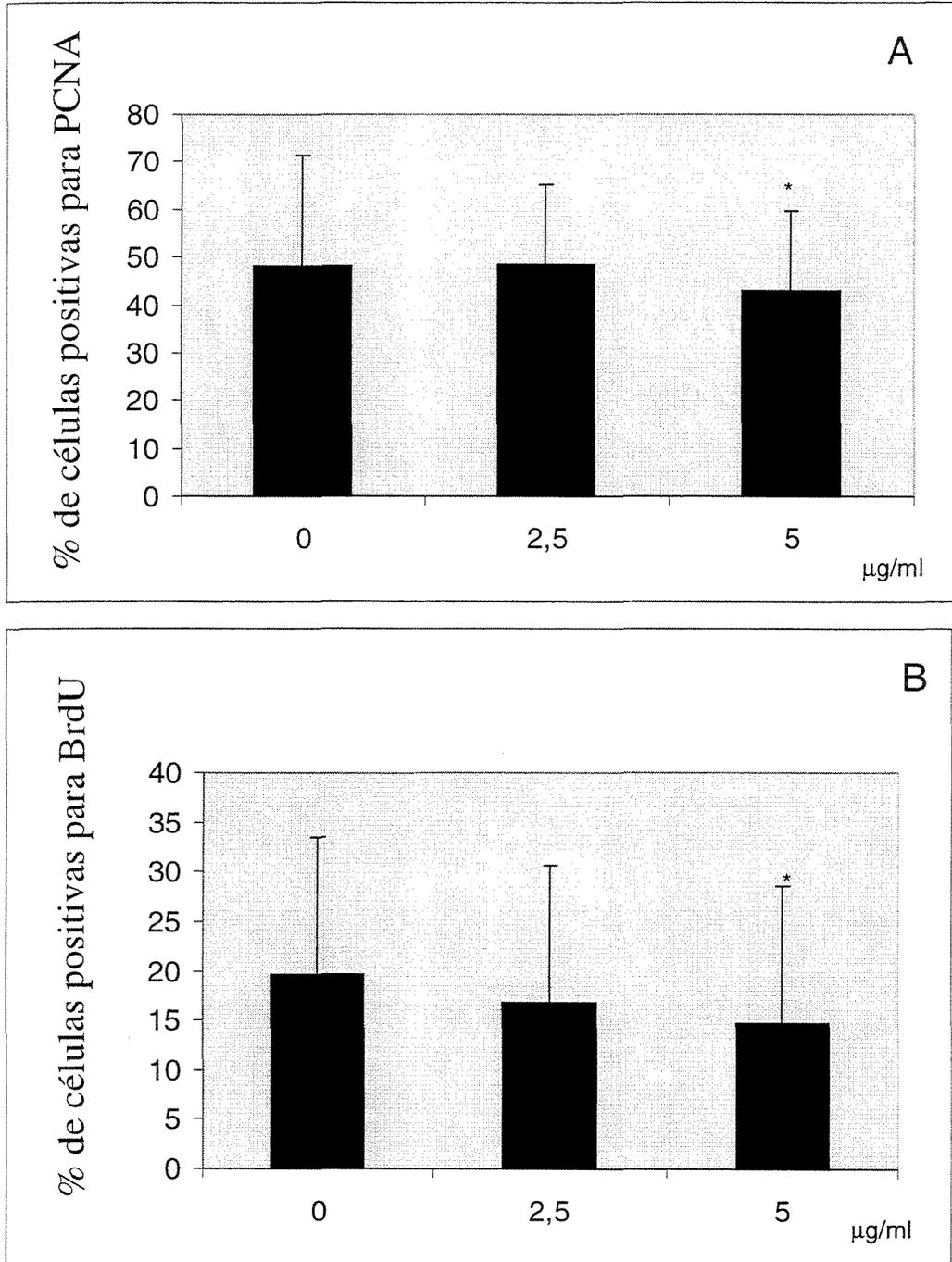


FIGURA 9 - Efeito do anticorpo anti-TGF- β 1 na expressão de PCNA (A) e na incorporação de BrdU (B) em duas linhagens celulares de FGH (FGH5 e FGH6). Fibroblastos foram cultivados na presença de 0, 2,5 ou 5 μ g/ml do anticorpo por 24h. Os valores representam a média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$

8. DISCUSSÃO

O aumento gengival pode ser provocado por drogas como fenitoína, ciclosporina e nifedipina (Marshall & Bartold, 1998), associado a condições inflamatórias e tumorais (Regezi & Sciubba, 1999) ou ainda ser transmitido de forma hereditária associado ou não a uma síndrome (Coletta et al, 1998). Na família aqui estudada, o aumento gengival generalizado é transmitido de modo autossômico dominante (Bozzo et al., 1994), e os indivíduos afetados não apresentaram qualquer outra alteração freqüentemente associada a FGH, possuindo intelecto normal.

As características clínicas e histológicas da FGH estão bem estabelecidas na literatura (Redman et al., 1984; Danesh-Meyer & Holborow, 1993; Günhan et al., 1995), mas os mecanismos biológicos responsáveis pelo aumento gengival observado clinicamente são ainda incertos. O aumento na quantidade de tecido conjuntivo observado na FGH pode ser relacionado à proliferação de células residentes, aumento na síntese de colágeno e outras macromoléculas da MEC, desequilíbrio na relação síntese-degradação de MEC, ou devido a uma desregulação na produção de proteínas reguladoras, principalmente citocinas. Embora alguns autores tenham descrito aumento na síntese de MEC incluindo colágeno, fibronectina e proteoglicanos e, aumento nos níveis de proliferação celular em fibroblastos de FGH (Shirasuna et al., 1989; Tipton et al., 1997), os mecanismos bioquímicos envolvidos nesta doença continuam desconhecidos.

Os dados da literatura relativos a atividade proliferativa de fibroblastos de FGH são escassos e controversos. Johnson et al (1986), estudando fibroblas-

tos gengivais em cultura de uma criança de 13 anos de idade, portadora de aumento gengival generalizado, sem história de antecedentes familiares, demonstraram uma maior taxa de crescimento que as células obtidas de um adulto jovem normal. Shirasuna et al (1989) demonstraram que os fibroblastos gengivais isolados de dois irmãos afetados por FGH apresentaram menores taxas de crescimento quando comparado com células normais. Oikarinen et al (1990) relataram uma menor taxa proliferativa de fibroblastos gengivais isolados de um paciente acometido por FGH associada à deficiência de hormônios do crescimento, como descrito previamente por Johnson et al (1986) e Shirasuna et al (1989). Nossos resultados prévios (Coletta et al, 1998) e os de Tipton et al (1998) foram diferentes aos anteriormente descritos, ao descrevermos uma velocidade de crescimento maior em fibroblastos de FGH.

Explicações para esta diversidade de resultados são difíceis. Contudo, possíveis explicações incluem diferenças nas condições de cultura como obtenção e manuseio das linhagens celulares e variações inter-individuais dos pacientes influenciadas por fatores sistêmicos e/ou ambientais. A paciente do estudo de Johnson et al. (1986) apresentava hipertricose, macroglossia e anomalias faciais em associação com o aumento gengival. Estes autores classificaram este caso como síndrome de Zimmerman-Laband. No trabalho de Oikarinen (1990) paciente apresentava além do aumento gengival, deficiência nos níveis de hormônios do crescimento. Os pacientes do estudo de Shirasuna et al. (1989) e Tipton et al. (1997) não apresentaram nenhuma outra alteração em associação com a FGH, assim como foram os pacientes do nosso estudo; desta forma, as diferenças en-

contradas entre estes estudos podem ter sido influenciadas por variações inter-individuais.

Outra possível explicação para tal diversidade de resultados pode ser apoiada na teoria da subpopulação celular proposta por Hassell & Cooper (1980) e confirmada por Phipps et al. (1997). Estes autores demonstraram que existem subpopulações de fibroblastos gengivais com diferenças genotípicas e funcionais, mas com similaridades morfológicas, em tecidos normais e alterados. Esta hipótese de diferentes subpopulações celulares é suportada por diferenças significantes nos níveis de produção de várias moléculas da MEC como colágeno, fibronectina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos (Ko et al., 1977; Bordin et al., 1984; Narayanan & Page, 1985). Estes estudos sugerem que alterações no tecido conjuntivo gengival podem ser resultado da estimulação e da instabilidade das subpopulações de fibroblastos residentes, e não, da presença de um novo tipo alterado, sendo que as proporções dos vários subtipos celulares e as atividades podem ser reguladas por mediadores químicos tal como citocinas. Yokozeki et al., 1997, estudando fibroblastos isolados do palato duro de ratos, identificaram um aumento na diferenciação e proliferação de feridas cirúrgicas com a adição de TGF- β 1.

A heterogeneidade genética que a FGH apresenta na literatura pode justificar as diferenças encontradas nos estudos. Hart et al (1998) sugeriram que o provável gene alterado na FGH localiza-se cromossomo 2 entre os loci D2S1788 e D2S441. Em estudo semelhante realizado por Xiao et al (2000), analisando quatro famílias portadoras de FGH, foi verificado uma provável alteração relacionada a

FGH localizada no locus D2S352 e D2S2163, que sobrepõe uma distância de 3.8 cM da região anteriormente descrita por Hart et al (1998). Contudo, nossa família não apresentou alinhamento cromossômico similar (Hart et al, 2000). Futuras investigações poderão elucidar se as variações encontradas nas culturas de células de FGH estão relacionadas com diferenças genéticas como mutação gênica, alélica ou não-alélica.

Outro fato importante que apóia o uso desta hipótese na FGH está relacionado com o início das manifestações clínicas. A FGH é raramente observada ao nascimento ou meses após o nascimento. O notável aumento gengival necessário para o diagnóstico da doença é apenas observado durante as fases de erupção da dentição decídua, sugerindo que o trauma e/ou os produtos da inflamação gengival podem contribuir para a seleção e ativação de subpopulações de fibroblastos capazes de proliferar mais rapidamente e/ou sintetizar elevados níveis de MEC. Embora as condições inflamatórias sejam de curta duração, fibroblastos de tecidos fibróticos, pelo menos *in vitro*, podem manter o fenótipo ativado mesmo na ausência de fatores de estimulação (Le Roy, 1974; Duncan & Berman, 1987; Jordana et al., 1988).

Embora nossos resultados de proliferação estejam em divergência com alguns trabalhos na literatura que utilizam fibroblastos gengivais de pacientes com FGH, é interessante notar que estes resultados são consistentes com vários estudos de drogas induzindo hiperplasia gengival (Vernillo & Schwartz, 1987; Narayanan et al., 1988; Salo et al., 1990), e estudos de desordens fibróticas que atingem pulmões, rins e pele (Le Roy, 1974; Thompson & Holliday, 1983; Jordana et al.,

1988). Fibroblastos gengivais de pacientes com hiperplasia gengival induzida por fenitoína ou nifedipina mostraram maior velocidade de proliferação que pacientes não reativos as drogas (Narayanan et al., 1988; Fujii et al., 1994).

Os experimentos iniciais deste estudo demonstraram que fibroblastos gengivais isolados de pacientes com FGH apresentam índices de proliferação significativamente maiores que fibroblastos provenientes de GN. Embora estes resultados sejam importantes para o melhor entendimento da taxa proliferativa de fibroblastos de FGH, estes estudos foram apenas descritivos. Para aprofundar os conhecimentos nos mecanismos relacionados a estimulação da proliferação de fibroblastos de FGH, nós utilizamos estudos funcionais para avaliar o papel do efeito autócrino de TGF- β 1, que é produzido em grandes quantidades por fibroblastos de FGH, na estimulação da proliferação destas células. Na primeira série de estudos, nós verificamos se TGF- β 1 é um estimulador de proliferação celular de fibroblastos de GN. Nestes estudos foram selecionadas aleatoriamente duas linhagens celulares de GN, que foram expostas às concentrações crescentes de TGF- β 1. Na segunda série de experimentos, nós utilizamos oligonucleotídeos antisense e anticorpos neutralizantes, que são específicos para o bloqueio da produção e atividade de TGF- β 1 respectivamente, para avaliar o papel de TGF- β 1 como estimulador da proliferação de fibroblastos de FGH. Oligonucleotídeos e anticorpos são usados com sucesso para inibir a síntese e atividade de um grande número de proteínas incluindo TGF- β 1 (Le Roy et al., 1998; Tipton et al., 1998; Coletta et al., 1999; Kanto et al., 1997). O presente estudo utilizou oligonucleotídeos sen-

se como controle para a comparação com o efeito de oligonucleotídeos antisense e, frente ao potencial de toxicidade induzido pelos reagentes de transfecção (LipofectAMINATM, Gibco), nossa preocupação foi assegurar que as condições experimentais não promovessem excessiva toxicidade.

TGF- β 1 é o protótipo de uma família de proteínas que controla a proliferação celular, diferenciação e outras funções em muitos tipos celulares (Kingsley et al., 1994). Embora alguns estudos tenham descrito que TGF- β 1 ativa diferentes receptores citoplasmáticos de serina-treonina quinases, pouco é conhecido sobre a exata via de atuação de TGF- β 1 (Alevizopoulos et al., 1997). Foi sugerido que a estimulação de TGF- β 1 na proliferação celular está associada com a inibição da atividade dos produtos dos genes supressores de tumor Rb e p15 (Alexandrow & Moses, 1995) e com a ativação do fator de transcrição TAK1 (Yamaguchi et al., 1995). A proteína Rb é uma molécula chave no controle do ponto de checagem que ocorre na fase G1 do ciclo celular. Esta proteína bloqueia a formação dos complexos de ciclina E e com sua quinase dependente (cdk-2), desta forma, bloqueia a liberação do fator de transcrição E2F-1, o qual é essencial para a transição entre as fases G1 e S do ciclo celular (Scully et al., 2000). TGF- β 1 é um potente inibidor do crescimento de queratinócitos em cultura. Por outro lado, estimula a proliferação de fibroblastos, não apenas por estimular a transição da fase G1 para a fase S, mas também incurrir a duração da fase G1 do ciclo celular (Kim et al., 1998).

A adição de TGF- β 1 à cultura de fibroblastos de GN em variadas concentrações (0,1; 1 e 10ng/ml) promoveu um crescente estímulo na proliferação celular. Contudo, esta estimulação foi significativa apenas para a concentração de 0,1ng/ml. Resultados semelhantes foram encontrados por Oates et al. (1994) utilizando células derivadas de ligamento periodontal. Os resultados deste estudo juntamente com resultados anteriores (Oates et al., 1994; Ishikawa et al., 1990 e Battegay et al., 1990) indicam que TGF- β 1 apresenta um efeito na proliferação celular de fibroblastos gengivais com padrão bimodal, isto é, efeitos distintos produzidos por diferentes concentrações da citocina.

Nossos resultados prévios demonstraram que os fibroblastos de FGH são diplóides e apresentam uma grande porcentagem de células nas fases S e G2/M e uma pequena fração de células na fase G1/0 do ciclo celular. No presente estudo, nós estendemos estas observações demonstrando que a proliferação de fibroblastos de FGH foi significativamente reduzida pelo bloqueio da produção ou da atividade autócrina de TGF- β 1. A redução nos níveis de TGF- β 1 pelo bloqueio da síntese protéica por oligonucleotídeos antisense foi acompanhada por um aumento na porcentagem de células na fase G1 do ciclo celular (resultados não demonstrados), sugerindo que TGF- β 1, em uma função autócrina, é requerido para a transição entre as fases G1 e S do ciclo celular de fibroblastos de FGH. Nossos resultados também revelam que o efeito autócrino de TGF- β 1 é um importante fator que contribui para as elevadas taxas proliferativas de fibroblastos de FGH.

TGF- β 1 pode estimular a proliferação de fibroblastos de FGH de forma direta ou indireta, isto é, inibindo a ação dos produtos dos genes supressores de tumores Rb e p15 ou estimulando a síntese de colágeno. Esta citocina é um importante modulador da matriz extracelular por estimular a síntese de colágeno e outras macromoléculas e por inibir a síntese de MMPs (O'Kane & Ferguson, 1997). É bem aceito na literatura que a proliferação de células em cultura entre outros fatores, é dependente da adesão celular ao frasco de cultura e que, esta adesão é mediada por macromoléculas da matriz extracelular, incluindo colágeno e fibronectina (Freshney, 1994). Apesar de não ter avaliado os níveis de expressão e produção de colágeno após o tratamento de fibroblastos de FGH com oligonucleotídeos antisense e anticorpos neutralizantes, podemos especular que a redução na taxa de crescimento dos fibroblastos de FGH foi também influenciada pela alteração nos níveis de colágeno promovido pela ausência do estímulo de TGF- β 1.

Em conclusão, nossos resultados obtidos de 4 diferentes ensaios de proliferação celular demonstraram que os fibroblastos de FGH apresentam índices de crescimento significativamente maiores que fibroblastos de GN. Adicionalmente, nosso estudo identificou que TGF- β 1 na sua fração autócrina é um estimulador de proliferação celular de fibroblastos de FGH. Novos estudos mostram-se necessários para determinar o papel de TGF- β 1 na ativação dos estimuladores específicos da proliferação de fibroblastos de FGH, incluindo as proteínas do grupo das ciclinas e das quinases dependentes de ciclina. Tais estudos permitirão uma com-

preensão melhor dos mecanismos bioquímicos e moleculares responsáveis pela elevada taxa de crescimento celular dos fibroblastos de FGH, que provavelmente estão associadas com a patogênese do aumento gengival observado em pacientes com FGH.

9. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos neste estudo foi possível concluir que:

- As linhagens celulares de fibroblastos provenientes da gengiva de pacientes da família com FGH acompanhada pelo departamento de diagnóstico oral, disciplina de Patologia (FOP-UNICAMP) apresentaram maior capacidade proliferativa em todos os métodos avaliados (incorporação de BrdU, índice de PCNA, índice mitótico e número de AgNORs), que fibroblastos de GN.
- A adição de TGF- β 1 ao meio de cultura de linhagens celulares provenientes de GN aumentou significativamente a taxa de crescimento celular para a concentração de 0,1ng/ml.
- A neutralização do efeito autócrino de TGF- β 1, através de oligonucleotídeos antisense e anticorpos anti-TGF- β 1 (AB-100-NA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), em fibroblastos de FGH foram acompanhadas por uma redução significativa na taxa de crescimento.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ABBAS, A.K. *et al.* *Cellular and molecular immunology*. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 1997. 192p.
2. ALBERTS, B. *et al.* *Molecular Biology of the cell*. 2.ed. New York: Garland Pub., 1994.
3. ALEVIZOPOULOS, A. *et al.* Regulation of the transforming growth factor β -responsive transcription factor CTF-1 by calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV. *J Biol Chem*, Bethesda. v.272, n.38, p.23597-23605, 1997.
4. ALEXANDROW, M.G., MOSES H.L. Transforming growth-factor- β and cell-cycle regulation. *Cancer Res*, Baltimore, v.55, p.1452-1457, 1995.
5. BAKAEEN, G., SCULLY, C. Hereditary gingival fibromatosis in a family with the Zimmermann-Laband syndrome. *J Oral Pathol Med*, Denmark, v.20, p.457-459, Apr. 1991.
6. BARROS, S.P. *Fibromatose gengival hereditária aspectos morfológicos e ultraestruturais*. Piracicaba, 1991. Tese (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
7. BECKER, W. *et al.* Hereditary gingival fibromatosis. *J Oral Surg*, Chicago, v.24, p.13-318, Sept. 1967.

* De acordo com a NBR 6023, de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos em conformidade como Medline.

8. BORDIN, J.S., PAGE, R.C., NARAYANAN, A.S. Heterogeneity of human diploid fibroblasts: isolation and characterization of gene phenotype. *Science*, Washington, v.223, n.5, p.171-173, 1984.
9. BOZZO, L., MACHADO, M.A.N., ALMEIDA, O.P. Hereditary gingival fibromatosis: report of three cases. *J Clin Pediatr Dent*, Birmingham, v.25 p.41-46, 2000.
10. BOZZO, L., SCULLY, C., ALDRED, M.J. Hereditary gingival fibromatosis: report of an extensive four generation pedigree. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, Chicago, v.78, p.452-464, July 1994.
11. BROWN, R.S. *et al.* Treatment of a patient with hereditary gingival fibromatosis: A case report. *Spec Care Dent*, Chicago, v.15, n.4, p.149-53, 1995.
12. CHATTERJEE, R. *et al.* Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in oral carcinomas in relation to human papillomavirus infection and cytogenetics. *J Oral Pathol Med*, Denmark, v.26, p.310-314, Mar. 1997.
13. CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, New York, v.162, p.156-159, May 1987.
14. COLETTA, R.D. *et al.*, Increase in expression of Hsp47 and collagen in hereditary gingival fibromatosis is modulated by stress and terminal procollagen n-propeptides. *Connect Tissue Res*, Philadelphia, v.40, n.4, p.237-249, Aug. 1999.

15. COLETTA, R.D. *et al.* Differential proliferation of fibroblasts cultured from hereditary gingival fibromatosis and normal gingiva. *J Periodontal Res*, Copenhagen, v.33, n.8, p.469-475, July 1998.
16. COLETTA, R.D. *et al.* Alteration in expression of MMP-1 and MMP-2 but not TIMP-1 and TIMP-2 in hereditary gingival fibromatosis is mediated by TGF- β 1 autocrine stimulation. *J Periodontal Res*, Copenhagen, v.34, n.8, p.457-463, 1999.
17. COLLAN, Y. *et al.* Histochemical and biochemical study of hereditary fibrous hyperplasia of the gingiva. *Scand J Dent Res*, Copenhagen v.90, p.20-28, 1982.
18. CUESTAS-CARNEIRO, R., BORNANCINI, C.A. Hereditary generalized gingival fibromatosis associated with hypertrichosis: report of five cases in one family. *J Oral Maxillofac Surg*, Philadelphia, v.46, p.415-420, 1988.
19. DANESH-MEYER, M.J., HOLBOROW, D.W. Familial gingival fibromatosis: a report of two patients. *N Z Dent J*, Dunedin, v.89 n.119-22, 1993.
20. DEFACQUE, H. *et al.* Transforming growth factor- β 1 is an autocrine mediator of U937 cell growth arrest and differentiation induced by vitamin D3 and retinoids. *J Cell Phys*, Bataillon, v.178, p.109-119, Aug. 1999.
21. DERENZINI M.; The AgNORs. *Micron*, v.31, p.117-120, 2000
22. DOVER, R., PATEL, K. Improved methodology for detecting bromodeoxyuridine in cultured cells and tissue sections by immunocytochemistry. *Histochemistry*, Berlin, v.102, p.383-387, Aug. 1994.

23. DUNCAN, M., BERMAN B. Persistence of a reduced-collagen-producing phenotype in cultured scleroderma fibroblasts after short-term exposure to interferons. *J Clin Invest*, New York, v.79, p.1318-1324, 1987.
24. ECKL, P.M., RAFFELSBERGER, I. The primary rat hepatocyte micronucleus assay: general features. *Mut Res*, Amsterdam, v.392, p.17-124, 1997.
25. EMERSON, T.G. Hereditary gingival hyperplasia: a family pedigree of four generations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, Chicago, v.19, n.1, p.1-9, Jan. 1965.
26. FLETCHER, J.P. Gingival abnormalities of genetic origin: a preliminary communication with special reference to hereditary generalized gingival fibromatosis. *J Dent Res*, Washington v.45, n.3, p.597-612, 1966.
27. FRESHNEY, I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 3.ed. New York: Wiley-Liss, 1994.
28. FUJII, A. *et al.* Effect of calcium-channel blockers on cell proliferation, DNA synthesis and collagen synthesis of cultured gingival fibroblasts derived from human nifedipine responders and nonresponders. *Arch Oral Bioll*, Oxford, v.39, p.99-104, 1994.
29. GOLDBLATT, J., SINGER S.L. Autosomal recessive gingival fibromatosis with distinctive facies. *Clin Genet*, Copenhagen, v.42, p.306-308, July 1992.
30. GORLIN, R.J., COHEN, M.M., LEVIN, L.S. *Syndromes of the head and neck*. 3.ed. New York: Oxford University Press, 1990. p.847-858.

31. GRATZNER, H.G. Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, Washington, v.218, n.29, p.474-475, Oct. 1982.
32. GÜNHAN, Ö. *et al.* Familial gingival fibromatosis with unusual histologic findings. *J Periodontol*, Chicago, v.66, n.11, p.1008-1012, Nov. 1997.
33. HART, T.C. *et al.* Genetic linkage of hereditary gingival fibromatosis to chromosome 2p21. *Am J Hum Gen*, Baltimore, v.62, n.4, p.876-883, Apr. 1998.
34. HART, T.C. *et al.* Evidence of genetic heterogeneity for hereditary gingival fibromatosis. *J Dent Res*, Washington, v.79, n.10, p.1758-1764, Feb. 2000.
35. HASSELL, T.M., COOPER, G.C. Phenytoin-induced gingival overgrowth in mongrel cat model. In: HASSELL, T.M., JOHNSON, M.C., DUDLEY, K.H. (Ed.) *Phenytoin-Induced Teratology and Gingival Pathology*. New York: Raven Press, 1980. p.147-162.
36. HEFTI, A. Aspects of cell biology of the normal periodontium. *J Periodontol*, Chicago, v.3, p.64-75, 2000.
37. HOJO, M. *et al.* Cyclosporin induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature*, London, v.397, p.530-534, 1999.
38. IGNOTZ, M.D., MASSAGUE. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem*, Bethesda, v.261, n.9, p.4337-4345, Mar. 1986.

39. IMBERT, A.M. *et al.* A neutralizing anti-TGF- β 1 antibody promotes proliferation of CD34 +Thy-1 peripheral blood progenitors and increases the number of transduced progenitors. *Exp Hem*, Marseille, v.26, p.374-381, aug. 1998.
40. JASKULSKI, D. *et al.* Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. *Science*, Washington, v.240, p.1544-1548, Apr. 1988.
41. JOHNSON, B.D. *et al.* A defect in fibroblasts from an unidentified syndrome with gingival hyperplasia as the predominant feature. *J Periodontal Res*, Copenhagen, v.21, p.403-413, 1986.
42. JORDANA, M. *et al.* Heterogeneous proliferative characteristics of human adult lung fibroblasts line and clonally derived fibroblasts from control and fibrotic tissue. *Am Rev Resp Disp*, New York, v.137, p.579-584, 1988.
43. JORGENSON, R.J., COCKER, M.E. Variation in the inheritance and expression of gingival fibromatosis. *J Periodontol*, Chicago, v.45, n.7, p.472-477, July 1974.
44. JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
45. KANTO, T. *et al.* Neutralization of transforming growth factor β 1 augments hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte induction in vitro. *J Clin Immunol*, Edinburgh, v.17, p.462-471, 1997.
46. KHARBANDA, O.P. *et al.* Gingival fibromatosis: study of three generations with consanguinity. *Quintessence Int*, Berlin, v.24, n.3, p.161-165, 1993.

47. KIM, D.S., KORTING, H.C., SCHAFER-KORTING, M. Effects of growth factors on the proliferation of human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Pharmazie*, Berlin, v.53, p.51-57, 1998.
48. KO, S.D., PAGE, R.C., NARAYANAN, A.S. Fibroblast heterogeneity and prostaglandin regulation of subpopulations. *Proc Natl Acad Sci*, New York, v.74, n.6, p.3429-3432, 1977.
49. KRATZ, C.L., MORIN, C.K. Hereditary gingival fibromatosis: a child affected with concurrent abnormalities. *J Pedod*, Boston, v.11, n.182, p.187-192, 1987.
50. LAIHO, M., KEISH-OJA, J. Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: a review. *Cancer Res*, Baltimore, v.49, p.2533-2553, 1989.
51. LE ROY, C. *et al.* Antisense oligonucleotide targeting the transforming growth factor beta1 increases expression of specific genes and functions Leydig cells. *Eur J Biochem*, Berlin, v.257 p.506-514, June 1998.
52. LE ROY, E., Increased collagen synthesis by scleroderma skin in vitro. *J Clin Invest*, New York, v.54, p.880-889, 1974.
53. LEE, W. *et al.* AgNOR of human interphase cells in relation to acrocentric chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet*, New York, v.113, p.14-18, Dec. 1999.
54. MACHADO, M.A.N. *Análise dos heredogramas e das correlações clínicas da fibromatose gengival hereditária numa família de 219 pessoas*. Piracicaba, 1996. Tese (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

55. MARSHAL, R.I., BARTOLD, P.M. Medication induced gingival overgrowth. *Oral Disease*, v.4, p.130-151, 1998.
56. MARTELLI-JÚNIOR, H. *et al.* Comparação microscópica e proliferativa de fibroblastos gengivais de pacientes com gengiva normal e com fibromatose gengival hereditária. *Pesq Odont Bras*, São Paulo, v.14, n.2, p.123-129, abr./jun. 2000.
57. MASSAGUE, J. The transforming growth factor-beta family. *Ann Rev Cell Biol*, Palo Alto, v.6, p.597-641, 1990.
58. NARAYANAN, A.S., PAGE, R.C. Synthesis of type V collagen by fibroblasts derived from normal, inflamed and hyperplastic human connective tissues. *Collagen Rel Res*, Stuttgart, v.5, p.297-304, 1985.
59. NICHOLSON, M.L. *et al.*, Is TGF-beta an profibrotic cytokin in human renal transplants? *Transplant Proc*, New York, v.30, n.952, 1998.
60. O'KANE, S., FERGUSON, M.W.J. Transforming growth β s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*, Great Britain, v.29, n.1, p.63-78, Jan. 1997.
61. OIKARINEN, K. *et al.* Hereditary gingival fibromatosis associated with growth hormone deficiency. *Br J Oral Maxillofac Surg*, Edinburgh, v.28, p.335-339, 1990.
62. OTHMAN, O.E.S. Cytogenetic effect of the anticancer drug epirubicin on Chinese hamster cell line in vitro. *Mutation Res*, Amsterdam, v.468, p.109-115, Apr. 2000.

63. OVERALL, C.M., WRANA, J.L., SUDEK, J. Induction of formative and resorptive cellular phenotypes in human gingival fibroblasts by TGF-β1 and concanavalin A; regulation of matrix metalloproteinases and TIMP. *J Periodontal Res*, Copenhagen, v.26, p.279-282, 1989.
64. PETERS, H., FREEMAN, M.R., FERNANDEZ, C.A.I. Targeting TGF-beta overexpression in renal disease: maximizing the antifibrotic action of angiotensin II blockade. *Kidney Int*, New York, v.54, p.1570-1580, 1998.
65. PHIPPS, R.P., BARELLO, M.A., BLIEDEN, T.M. Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. *J Periodontal Res*, Copenhagen, v.32, n.9, p.159-165, 1997.
66. RAGHOW, R. *et al.* Transforming growth factor-beta increase steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *J Clin Invest*, New York, v.79, p.1285-1288, 1987.
67. RAMER, M. *et al.* A case report, hereditary gingival fibromatosis: identification, treatment, control. *J Am Dental Assoc*, Chicago v.127, p.493-95, Apr. 1996.
68. RAMON, Y., BERMAN W., BUBIS J.S. Gingival fibromatosis combined with cherubism. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, Chicago, v.24, p.435-448, 1967.
69. REDMAN, R.S., WARD, C.C., PATTERSON, R.H. Focus of epithelial dysplasia arising in hereditary gingival fibromatosis. *J Periodontol*, Chicago, v.56, n.3, p.158-162, May 1984.

70. REGEZI, J.A., SCIUBBA, J.J. *Oral Pathology: clinical pathologic correlations*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
71. ROBERTS, A.B. *et al.* New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, Washington, v.78, p.5339-5343, 1981.
72. SALO, T., OIKARINEN, K.S., OIKARINEN, A.I. Effect of phenytoin and nifedipine on collagen gene expression in human gingiva fibroblasts, *J Oral Pathol Med*, Denmark, v.19, p.404-407, 1990.
73. SANGUINETTI, DIAS NETO E., SIMPSON A.J., Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, Natick, v.17, p.914-921,1994.
74. SCHIPPER, D.L. *et al.* Significance of cell proliferation measurement in gastric cancer. *Eur J Cancer*, Oxford, v.34, n.6, p.781-790, Oct. 1998.
75. SCULLY, C., FIELD, J.K., TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol*, Oxford, v.36, p.256-263, June 2000.
76. SHIRASUNA, K. *et al.* A sibling case of congenital gingival fibromatosis: treatment and post-operative evaluation. *J Osaka Univ Dent Sch*, Osaka, v.28, p.1-8, 1989.
77. SIBALIC, V. *et al.* Characteristics matrix and tubular basement membrane abnormalities in the CBA/Ca-kdkd mouse model of hereditary tubulointerstitial disease. *Nephron*, Basel, v.80, p.305-313, Nov. 1998.

78. SINGER, S.L. *et al.* Hereditary gingival fibromatosis with a recessive mode of inheritance. Cases reports. *Aust Dent J*, Saint Leonards, v.38, n.6, p.427-432, July 1993.
79. SIRRI, V., ROUSSEL, P., HERNANDEZ-VERDUN, D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron*, Watford Herts, v.31, p.121-126, 2000.
80. SPORN, M.B. *et al.* Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol*, New York, v.195, p.1039-1045, Sept. 1987.
81. TAKAGI, M. *et al.* Heterogeneity in the gingival fibromatosis. *Cancer*, New York, v.15, p.2202-2212, 1991.
82. THOMPSON, K., HOLLIDAY, R. Genetic effects on the longevity of cultured human fibroblasts. IV. Enhanced growth potential of cystic fibrosis cells. *Gerontology*, Basel, n.29, p.97-101, 1983.
83. TIPTON, D.A., DABBOUS, M.K. Autocrine transforming growth factor beta stimulation of extracellular matrix production by fibroblasts from fibrotic human gingiva. *J Periodontol*, Chicago, v.69, n.6, p.609-619, 1998.
84. TIPTON, D.A., HOWELL, K.J., DABBOUS, M.K. Increased proliferation, collagen, and fibronectin production by hereditary gingival fibromatosis fibroblasts. *J Periodontol*, Chicago, v.68, n.6, p.524-530, June 1997.
85. TRÉRE, D., AgNOR staining and quantification. *Micron*, Watford Herts, v.31, p.127-131, 2000.

86. TSURIMOTO T., PCNA, a multifunctional ring on DNA, *Bioch Bioph Acta*, Amsterdam, v.1443, p.23-39, 1998.
87. TUCKER, R.F. *et al.* Comparison of intra and extracellular transforming growth factor from non-transformed and chemically transformed mouse embryo cells. *Cancer Res*, Baltimore, v.43, p.1581-1586, Sept. 1983.
88. VANDELAER, M., THIRY, M., GOESSENS, G. AgNOR proteins from morphologically intact isolated nucleoli. *Life Sciences*, Oxford, v.64, n.22, p.2039-2047, Feb. 1999.
89. VERNILLO, A.T., SCHWARTS, N.B. The effects of phenytoin (5,5-diphenylhydantoin) on human gingival fibroblasts in culture. *J Periodontal Res*, Copenhagen, v.22, p.307-312, 1987.
90. WYNNE, S.E., ALDRED, M.J., BARTOLD, M. Hereditary gingival fibromatosis associated with hearing loss supernumerary teeth: a new syndrome. *J Periodontol*; Chicago, v.66, n.1, p.75-79, Jan. 1995.
91. XIAO, S. *et al.* Refinement of the Locus for Autosomal Dominant Hereditary Gingival Fibromatosis (GINGF) to a 3.8-cM Region on 2p21. *Genomics*, Orlando, v.68, p.247-252, June 2000.
92. YAMAGUCHI, K. *et al.* Identification of a member of the MAPKK family as a potential mediator of TGF- β signal transduction. *Science*, Washington, v.270, p.2008-2011, 1995.
93. YOKOZEKI, M. *et al.* Transforming growth factor- β 1 modulates myofibroblastic phenotype of rat palatal fibroblasts *in vitro*. *Exper Cell Res*, New York, v.231, p.328-336, Sept. 1997.

94. ZACKIN, S.J., WEISBERGER, D. Hereditary gingival fibromatosis: report of a family. *J Oral Pathol*, Denmark, v.14, p.828-836, 1961.

95. ZAUNER W., BRUNNER S., BUSCHLE M. *et al.*, Differential behaviour of lipid based and polycation based gene transfer systems in transfecting primary human fibroblasts: a potential role of polyllysine in nuclear transport. *Bioch Bioph Acta*, Basel, v.1428, p.57-67, Feb. 1999.

11. ANEXOS E APÊNDICES

11.1. Certificado do Comitê de Ética



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba
CEP-FOP-UNICAMP



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Estudo bioquímico do estímulo autócrino de TGF- β 1 e análise ultraestrutural e do perfil oligossacarídico de HSP47 em fibroblastos gengivais normais tratados com ciclosporina e em fibroblastos de pacientes com fibromatose gengival hereditária", sob o protocolo nº **64/99**, do Pesquisador(a) **Cleverton Roberto de Andrade e Ana Paola Contrin Zuniga**, sob a responsabilidade do Prof(a). Dr(a). **Ricardo Della Coleta**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - FOP.

Piracicaba, 03 de novembro de 1999

We certify that the research project with title "Biochemical study of TGF β 1 autocrine stimulation and ultrastructural and Hsp47 oligosaccharide analysis of gingival fibroblasts treated with cyclosporin and of fibroblasts from patients with hereditary gingival fibromatosis-", protocol nº **64/99**, by Researcher **Cleverton Roberto de Andrade and Ana Paola Contrin Zuniga**, responsibility by Prof. Dr. **Ricardo Della Coleta**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, 03 november 99

Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Secretário - CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes
Coordenador - CEP/FOP/UNICAMP

11.2. Cópia do trabalho enviado para publicação

TGF-β1 autocrine stimulation regulates fibroblast proliferation in hereditary gingival fibromatosis

C.R. de Andrade,* P. Cotrin,* E. Graner,* O.P. Almeida,* J.J. Sauk,^{†,‡} and R.D. Coletta*

* Discipline of Oral Pathology, University of Campinas Dental School, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

† Department of Pathology, University of Maryland Dental School, Baltimore, MA.

‡ Greenebaum Cancer Center, University of Maryland.

All correspondence should be sent to: Dr. R.D. Coletta, Discipline of Oral Pathology, University of Campinas Dental School, CP 52, CEP 13414-018 Piracicaba, São Paulo, Brazil. e-mail: coletta@fop.unicamp.br

Background: Hereditary gingival fibromatosis (HGF) is a rare oral disease characterized by a slow and progressive enlargement of both the maxilla and mandible gingiva. Increased proliferation, elevated synthesis of extracellular matrix, particularly collagen, and reduced levels of matrix metalloproteinases seem to contribute to the pathogenesis of gingival overgrowth in HGF patients. Transforming growth factor-β1 (TGF-β1) is an important cytokine thought to play a major role in fibrotic disorders, such as HGF, due to its ability to stimulate the synthesis and reduce the degradation of extracellular matrix. In HGF fibroblasts, TGF-β1 auto-

crine stimulation reduces expression and production of matrix metalloproteinases. However, the role of TGF- β 1 in the fibroblast growth modulation has not been established in this disease.

Methods: The aim of this study was confirm the increased proliferation rate of HGF fibroblast cell lines and to explore a possible autocrine role of TGF- β 1 as a cell growth stimulator by blocking production of this endogenous cytokine using two well established systems: antisense oligonucleotides and neutralizing antibodies.

Results: Four different cellular proliferation assays: BrdU-labeling, AgNOR, PCNA and mitotic indexes confirmed that fibroblasts from HGF proliferate significantly faster than those from normal gingiva. Antisense oligonucleotides reduced TGF- β 1 production as demonstrated by capture ELISA, whereas TGF- β 1 expression levels were not significantly modified. Blocking TGF- β 1 synthesis with oligonucleotides or its activity with specific antibodies resulted in a decreased magnitude of HGF fibroblast proliferation.

Conclusion: These results are consistent with the existence of an autocrine role of TGF- β 1 as a stimulator of HGF fibroblast proliferation. *J Periodontol 2001*

KEY WORDS

Hereditary gingival fibromatosis; fibroblast, proliferation index, transforming growth factor- β 1.

Hereditary gingival fibromatosis (HGF) is a rare oral disease characterized by a slow and progressive enlargement of both the maxilla and mandible gingiva.¹ Males and females are equally affected as a phenotype frequency of 1:175,000.² The enlarged gingiva has normal color, fibrous consistency, non-hemorrhagic and asymptomatic. The gingival hyperplasia may be generalized or partial, involving only localized portions of maxilla and mandible, and the degree of enlargement may vary from mild to severe, same between individuals within the same family.³ HGF may occur as an isolated finding or as part of a syndrome,⁴ associated with hypertrichosis,^{5,6} mental retardation,⁷ epilepsy,⁸ progressive sensorineural hearing loss⁹ or abnormalities of the extremities, particularly of fingers and toe.^{10,11} In most of the cases, an autosomal dominant mode of inheritance is involved, however, the disease may be found as an autosomal recessive disorder.¹²⁻¹⁴ Histologically, the gingiva is characterized by dense connective tissue rich in collagen fibers, covered by hyperplastic epithelium with long rete pegs.^{15,16}

The biochemical events involved in HGF are not well understood at present. However, these events are probably a consequence of disturbances in the homeostatic equilibrium between synthesis and degradation of extracellular matrix molecules or alteration in the fibroblast proliferation.¹⁷⁻²¹ In our previous studies,^{22,23} we found that cultured HGF fibroblasts are phenotypically distinct from normal human gingival (NG) fibroblasts and have a significantly higher growth rate than NG fibroblasts. On the other hand, Johnson et al.²⁴ and Shirasuna et al.¹⁷ reported that HGF fibroblasts showed a lower proliferation rate than those from control individuals. Fibroblast proliferation can be regulated by a variety of agents including the

cytokine transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) stimulation.^{25,26} In response to TGF- β 1, gingival fibroblasts upregulate the rate of proliferation.²⁵⁻²⁷ The aim of the present study was verify the proliferation rates of HGF fibroblasts isolated from gingiva of 12 members of the same family and to compare these results with fibroblasts isolated from individuals with normal gingiva. Additionally, we assessed the role of autocrine stimulation by TGF- β 1, which is produced in higher amounts by HGF fibroblasts,²⁰ on the proliferation rates of these cells using two well documented models: antisense oligonucleotides directed against and overlapping the translation-start site of the TGF- β 1 mRNA and neutralizing antibodies.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Human gingival fibroblast primary cultures were established using tissue explants obtained by gingivectomy/gingivoplasty from 12 patients affected by HGF and from 12 patients under periodontal treatment at the Orocentro - Center for the Study of Oral Diseases at the University of Campinas Dental School, Piracicaba-SP. All HGF patients were members of the same family, and only fibrous and non-inflamed gingival tissues overgrowth were selected. The mean age of HGF group was 22.66 ± 10.88 years and included six males and six females. Control fibroblasts were derived from non-inflamed or hyperplastic gingival of eight males and four females, with a mean age of 24.41 ± 3.72 years. The cultures of gingival fibroblasts were obtained as previously described.²² Cells were cultured in Dulbeccos's modified

Eagle's medium (DMEM)¹ containing 10% fetal bovine serum (FBS), 100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine at 37° C in a 5% CO₂ air atmosphere. All experiments were performed using cells between the third and tenth passages. The study protocol was approved by the Ethical Committee in Research at the University of Campinas Dental School. All patients were informed about the study's purpose before they consent to participate.

Bromodeoxyuridine-labeling (BrdU) index

HGF and NG fibroblasts were plated (30,000 cells per well) in 8-well glass culture chamber slides² and cultured at 37° C in humidified air containing 5% CO₂ for 24 h. Following incubation, cells were washed in PBS, and incubated with BrdU (diluted 1:1,000) for 1 h at 37° C in 5% CO₂. After incubation, cells were washed in PBS and fixed in 70% ethanol for 1 h. BrdU incorporation in proliferating cells was revealed using immunohistochemistry³. The BrdU-labeling index, expressed as the percentage of cells labeled with BrdU, was determined by counting 1,500 cells in three independent reactions for each HGF and NG fibroblast strain using an image analysis system KONTRON 400⁴.

¹ Gibco, BRL, Gaithersburg, MD.

² Nunc A/S, Roskilde, Denmark.

³ Amershan Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ.

⁴ Zeiss, Germany.

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) index

Cell suspensions (30,000 cells) were cultured in culture chamber slides as described above, fixed in 70% ethanol for 1 h and washed with PBS. Cells were then treated with 1% bovine serum albumin (BSA)⁵ diluted in PBS for 1 h, incubated with monoclonal antibodies against PCNA⁶ (diluted 1:3,000), and followed by the ABC method (StrepABC Complex/HRP Duet kit)^{††}. Reactions were developed with 0.6 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)** containing 0.01% H₂O₂. The PCNA index was calculated by counting labeled nuclei of 1,500 cells in three independent reactions for each HGF and NG fibroblast strain, and expressed in percentage.

Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining

The AgNOR technique was adapted from that described by Chatterjee et al.²⁸ HGF and NG fibroblasts (30,000 cells) were cultured in glass chamber slides for 24 h, fixed in 70% ethanol for 1h and rehydrated. The cells were then incubated for 30 min at 37^o C with a fresh solution containing one part of 1% gelatin in 1% formic acid and two parts of 50% aqueous silver nitrate. The AgNORs were visualized as intranuclear black dots under light microscopy. For each fibroblast strain, the number of AgNOR dots on 1,500 cells was determined using an image analysis system.

⁵ Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

⁶ Dako Corp. Carpinteria, CA.

Mitotic index

HGF and NG gingival fibroblasts were plated in glass chamber slides, cultured for 24 h in DMEM supplemented with 10% FBS, fixed in 70% ethanol, and then stained with hematoxylin and eosin (H&E). Thirty randomly selected microscopic fields of 0.0256 mm² (approximately 1,000 cells) were examined for each fibroblast strain and the number of cells in mitosis determined. Mitotic index was expressed as the percentage of cells in mitosis per field \pm SD.

Treatment of NG fibroblasts with TGF- β 1

NG fibroblasts were plated in 8-well chamber slides at a density of 30,000 cells per well, in 500 μ l of DMEM containing 10% FBS. After 16 h, the cells were washed with PBS and cultured in serum-free DMEM for an additional of 24 h. Following serum starvation, TGF- β 1⁷ in 2.5% charcoal-treated (CT)-FBS/DMEM was added to the cells at concentration of 0.1 ng/ml. Proliferation rates were determined 24 h after treatment, as described above.

⁷ R&D Systems, Minneapolis, MN.

Neutralization of TGF- β 1 translation using antisense oligonucleotides

Neutralization of TGF- β 1 autocrine stimulation on HGF fibroblasts (HGF2 and HGF5 cell lines) was performed as described by Le Roy et al.²⁹ with some modifications. Fibroblasts grown to 70%-confluence in 8-well chamber slides were incubated with serum-free DMEM for 24 h. Following serum starvation, the cells were transfected in 2.5% CT-FBS/DMEM with antisense or sense oligonucleotides by a cationic liposome-mediated transfection method. Antisense and sense 15-base deoxyribonucleotides corresponding to the translation-initiation region of TGF- β 1 mRNA were: antisense 5' GGA GGG CGG CAT GGG 3' and sense 5' CCC ATG CCG CCC TCC 3'. Briefly, oligonucleotides dissolved in one volume of DMEM without FBS were mixed with lipofectAMINE reagent⁸ dissolved in the same volume of medium and incubated for 45 min at room temperature. Thereafter, the oligonucleotide-liposome complexes were diluted with 8 volumes of medium resulting in 2.5% CT-FBS/DMEM containing 1 μ g/ml of each oligonucleotides and 1,25% of lipofectAMINE and, then added to the cells for 24 h. After incubation, the efficiency of the inhibition of TGF- β 1 was determined using reverse transcriptase-reaction chain polymerase (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The role of autocrine stimulation of TGF- β 1 on HGF fibroblasts proliferation rate was assessed by BrdU-labeling and PCNA indexes and, cytometric analysis.

⁸ Gibco, BRL, Gaithersburg, MD.

ELISA

After each treatment, the conditioned cell culture medium was used to quantify TGF- β 1 production by HGF cells, whether the cells were incubated in guanidine thiocyanate for total cellular RNA extraction. Before measurement, the latent form of TGF- β 1 was converted in to the active form, by treatment with 0.167 M HCl for 10 min, followed by neutralization with 1.2 M NaOH in 0.5 M HEPES. The samples were assayed using an ELISA kit⁹ according to the manufacturer's instructions. The values were expressed as percentage of inhibition of TGF- β 1.

⁹ R&D Systems, Minneapolis, MN.

RNA extraction and RT-PCR analysis

The expression of TGF-β1 in HGF fibroblasts after each oligonucleotides treatment was assessed by RT-PCR. Total cellular RNAs were isolated after the methods of Chomezynski and Sacchi³⁰ using the Trizol™ reagent kit¹⁰. The concentration and purity of RNA in each sample was determined by the absorption at 260/280 nm using a Genesys 2 spectrophotometer¹¹. Two micrograms of total RNA per sample were used to generate cDNAs using the Superscript II RNase H-reverse transcriptase^{†††}. The resulting cDNAs were subsequently amplified in a 50 µl reaction mixture containing 1 µM of each primer,³¹ 2 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTPs and 0.025 U/µl Taq DNA polymerase. β-actin was used as a housekeeping control. Primers for TGF-β1 were sense 5'

AAG TGG ATC CAC GAG CCC AA 3' and antisense 5' GCT GCA CTT GCA GGA GCG CAC 3' and for β-actin sense 5' TCA GAA GGA CTC CTA TGT GG 3' and antisense 5' TCT CTT TGA TGT CAC GCA CG 3'. After denaturation for 3 min at 93° C, 34 cycles of amplification were performed using a model 9700 thermocycler¹², followed by final extension of 10 min at 72° C. The cycling parameters were: denaturation for 30 s at 94° C, annealing for 1 min at 55° C, extension for 1 min at 72° C. After amplification, 2 µl of PCR product were electrophoresed on a 5% non-denaturing polyacrylamide gel and the PCR products stained with silver as described by Sanguinetti et al.³²

¹⁰ Gibco, BRL, Gaithersburg, MD.

¹¹ Spectronic Inst., Rochester, NY.

¹² Perkin Elmer, Foster City, CA.

Cytometric analyses

Propidium iodide¹³ was used to assess cell cycle and stain for dead cells. For these studies, $\sim 1 \times 10^5$ HGF fibroblasts treated with antisense or sense oligonucleotides were incubated with a hypotonic citrate solution containing PI to a concentration final of 1 mM. Cells were labeled for 20 min, and then analyzed on the FAC-Scan flow cytometer¹⁴. Fluorescence data were displayed on a four-decade log scale. A minimum of 10,000 events was collected on each sample. The percentage of cells with a G_{1/0}, S, and G₂/M DNA complement was determined from a DNA histogram by a region integration using onboard Multicycle^R data analysis routines¹⁵. All experiments were performed in duplicate.

Neutralization of TGF-β1 using specific antibodies

HGF fibroblasts (HGF2 and HGF5) grown to 70%-confluence were maintained in serum-free DMEM for 24 h, following incubation with 2.5% CT-FBS/DMEM containing 0 or 5.0 μg/ml of rabbit anti-TGF-β1 IgG¹⁶ for an additional of 24 h. Following treatment, proliferation analysis were performed as described.

¹³ Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

¹⁴ Becton Dickinson, San Jose, CA.

¹⁵ Phoenix Flow Systems, San Diego, CA.

¹⁶ R&D Systems, Minneapolis, MN.

Statistical analysis

Non-parametric one-way analysis of variance (ANOVA) was used to test group effects and treatments based on Kruskal-Wallis test at 5% of significance ($P < 0.05$). Multiple comparisons and orthogonal contrasts were used in order to detail some test of the detected effects. All assays were performed at least three times in triplicates or quadruplicates.

RESULTS

Proliferation of HGF fibroblasts

The proliferation rates of HGF and NG fibroblasts were assessed by measuring BrdU incorporation into DNA, PCNA expression and, quantification of AgNORs, besides determination of mitotic potential. In all fibroblasts strains, AgNOR were strictly located within the cell nucleus and were clearly visible as black dots. The mean number of AgNORs per nucleus is depicted on Table 1. Difference in the mean counts of AgNORs dots between groups of fibroblasts was small, but statistically significant ($p < 0.05$). Mitotic activity measured by direct counting showed significantly higher percentage of cells in mitosis in the HGF group compared to the control group (Table 1; $p < 0.0001$).

Nuclear immunoreactivity for BrdU and PCNA were clearly and easily identified in both groups. Nuclei with a clear brown color, regardless of staining, were interpreted as positive. Table 2 shows that HGF fibroblasts have a significantly higher BrdU-labeling index than NG strains ($P < 0.0001$). All HGF cell lines showed a faster proliferation rate than NG, with exception of NG3 that showed BrdU-

labeling index higher than the mean of HGF group. The percentage of BrdU-positive cells in HGF group ranged between 18 to 36%, with a median of 26% (mean 26.09% \pm 4.70), whereas for NG group ranged between 7 to 32%, with a median of 13% (mean 14.31% \pm 7.56). The labeling index for PCNA ranged between 15 and 39% with the median being 28% for the HGF group (mean 25.91% \pm 8.87) and between 13 and 35% with the median of 17% for NG group (mean 18.01% \pm 10.35) (Table 2). PCNA index of fibroblasts from HGF were significantly higher than those of control ($p < 0.01$).

Effect of exogenous TGF- β 1 on NG cell proliferation

To evaluate the effect of TGF- β 1 on NG cell proliferation, 2 cell lines were randomly selected and incubated for 24 h in the presence of 0.1 ng/ml of growth factor in DMEM supplemented with 2.5% of CT-FBS. Figure 1 illustrates the effect of TGF- β 1 on BrdU incorporation into DNA (A) and PCNA expression (B). In concentration of 0.1 ng/ml, TGF- β 1 produced higher proliferation indexes than the control. The response to TGF- β 1 at 0.1 ng/ml was statistically ($P < 0.05$) different from the control.

Effect of antisense oligonucleotides on expression and production of TGF- β 1 by HGF fibroblasts

Since TGF- β 1 stimulates NG fibroblasts proliferation, we sought to determine if the excessive production its cytokine by HGF cells, in an autocrine fashion, could me-

diate the proliferative behavior of those cells. To determine the efficacy of antisense oligonucleotides on the neutralization TGF- β 1 production, we investigated the amount of TGF- β 1 secreted in culture supernatants by 2 HGF cells lines (HGF2 and HGF5) by ELISA. In so doing, these studies revealed that antisense oligonucleotides significantly reduced TGF- β 1 production to 62% in comparison with sense oligonucleotides. Similar results were obtained by Le Roy et al.²⁹ using fibroblast-like cells isolated of interstitial tissue from testis. To confirm that TGF- β 1 antisense oligonucleotides promoted a translation arrest of TGF- β 1 mRNA, we studied the TGF- β 1 mRNA levels by RT-PCR. Neither antisense nor sense oligonucleotides modified significantly the levels of TGF- β 1 transcripts (data not shown).

Effect of antisense oligonucleotides on proliferation rate of HGF fibroblasts

The data of BrdU-labeling and PCNA indexes after oligonucleotide treatment of HGF cells are shown in Table 3. The mean of BrdU-labeling and PCNA indexes of HGF fibroblasts treated with antisense oligonucleotides were significantly lower than those treated with sense oligonucleotides ($P < 0.05$). Flow cytometric DNA content analysis demonstrated that antisense oligonucleotides treatment increased the percentage of cells in $G_{1/0}$ phase of cell cycle, decreasing the percentage of cells in other phases compared to sense oligonucleotides treatment (Table 4).

To further test the specificity of the antisense oligonucleotides, we examined whether exogenous TGF- β 1 could reverse the effects of antisense treatment. We

demonstrated that 0.1 ng/ml of TGF- β 1 partially reversed the effects of the antisense oligonucleotides on HGF cell proliferation (Table 5).

Effect of neutralizing antibodies against TGF- β 1 on HGF cell proliferation

The effect of TGF- β 1 on the cell proliferation of HGF cells was also confirmed with anti-TGF- β 1 neutralizing antibodies. Although previously it was shown that 5 μ g/ml of anti-TGF- β 1 neutralizing antibodies abrogated the effects of 500 μ g of TGF- β 1,^{20, 30, 31} we found that 5 μ g/ml of anti-TGF- β 1 was the optimal dose to neutralize 100% of TGF- β 1 produced by 1×10^6 HGF2 and HGF5 fibroblasts in 24 h. Utilizing these results, anti-TGF- β 1 antibodies were added directly to the medium of HGF cells, which produced a decrease in the proliferation rate. Figure 2 shows the values of BrdU-labeling and PCNA indexes after treatment with neutralizing antibodies against TGF- β 1 at concentration of 5 μ g/ml.

DISCUSSION

HGF is a heterogeneous disease of genetic origin characterized by an overgrowth of the gingival. The mechanism that leads to the accumulation of abnormal amounts of gingival tissue in HGF is still unknown. The excess accumulation of connective tissue has traditionally been regarded to result from local increases in collagen synthesis, which is consistent with the histological characteristics of the disease.¹⁷⁻¹⁹ However, recent studies have recognized the equally important role of connective tissue degradation and resident cell proliferation in the pathogenesis of HGF.^{20,22}

In our previous study,²² 4 fibroblasts strains isolated from affected members of a family with HGF were analyzed using 6 different proliferation assays. These results clearly showed that the proliferation rate was significantly higher in fibroblasts from HGF than those from NG. Although our previous results were similar to the findings of Tipton et al.,¹⁸ they were different from several other reports.^{17, 24, 33} To verify the cell proliferation potential of HGF fibroblasts, we isolated, cultured and evaluated the proliferative potential of 12 different cell lines from HGF patients. Previously we have shown that HGF fibroblasts are characterized by significantly increased proliferation rate comparing to NG fibroblasts. Each one of the HGF strain proliferated faster than NG lines, with exception of NG3 that showed higher growth rates than the mean of HGF cell lines. Such variations among cell lines have been previously attributed to subsets of fibroblasts that exist in gingiva and periodontum.^{34,35} Moreover, while HGF gene has been mapped with polymorphic markers in a region of chromosome 2p21 bounded by the genetic loci D2S1788

and D2S441³⁶ or loci D2S352 and D2S2163,³⁷ similar analyses of the same HGF family studied here have not supported a similar chromosome assignment.³⁸ Future investigations must be better clarifying if the variable cell-culture results are also correlates with genetic defect and with the variable expression of a common gene mutation, allelic mutations, or non-allelic mutations.

We undertook functional studies with antisense oligonucleotides and neutralizing antibodies to TGF- β 1 to determine the role of this cytokine, which has previously been demonstrated in elevate amounts in HGF, in HGF fibroblasts proliferation. Antisense reagents and antibodies have been successfully applied to inhibit the synthesis of a wide range of proteins, including TGF- β 1.^{19,20,29,31} TGF- β 1 is the prototype of the TGF- β superfamily of multifunctional peptides that controls cell proliferation, differentiation and other functions in many cell types.³⁹ Although recent studies have delineated the binding of TGF- β 1 to different serine-threonine receptor subtypes, little is known about its exact signaling pathways.⁴⁰ TGF- β 1 has a profound growth inhibitory effect in cultured keratinocytes. On the other hand, TGF- β 1 enhances fibroblast proliferation, not only by increasing the G₁/S transition and DNA synthesis, but also by shortening the G₁ phase of the cell cycle.⁴¹ Our previous results showed that HGF fibroblasts have uniform DNA diploidy with a higher S-phase (40.9%) and G₂/M (10.1%) fraction and a relatively low G₁ phase fraction (40.9%).²¹ In the present study, we extend these findings and further demonstrate that HGF proliferation was significantly reduced by blocking endogenous production and activity of TGF- β 1. Furthermore, blocking TGF- β 1 with anti-TGF- β 1

antibodies abrogated the mitogenic effect of TGF- β 1-induced HGF fibroblasts proliferation. Additionally, we demonstrate that the TGF- β 1 reduction is accompanied by an increase in the percentage of cells in G₁ phase of cell cycle, suggesting that TGF- β 1, in an autocrine fashion, mediates G₁/S transition of HGF fibroblasts and appears to be a major factor accounting for the growth stimulation of HGF cells. Our data also revealed that the TGF- β 1 signaling pathways are not compromised by the treatment with oligonucleotides, since exogenous TGF- β 1 partially reversed the effects of the antisense oligonucleotides.

In conclusion, our results obtained from 4 different cell proliferation assays showed that the cell proliferation rate was significantly higher in HGF fibroblasts than from NG. Additionally, our data identified that endogenous TGF- β 1 is an autocrine stimulator of HGF fibroblasts proliferation. Further studies are needed to determine the role of TGF- β 1 in activation of cyclins or cyclin-dependent kinases stimulators of HGF fibroblast proliferation. Such studies would give insights about the biochemical mechanisms characterized by an excess proliferation of HGF fibroblasts that possibly has a role in the pathogenesis of gingival overgrowth in HGF patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP proc. 99/08191-0 to Dr. R. D. Coletta and proc. 99/07933-3 to Dr. C. R. de Andrade.

REFERENCES

1. Bozzo L, Almeida OP, Scully C, et al. Hereditary gingival fibromatosis: report of an extensive four-generation pedigree. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78:452-454.
2. Singer SL, Goldblatt J, Hallam LA, et al. Hereditary gingival fibromatosis with a recessive mode of inheritance. Case reports. *Aust Dent J* 1993;38:427-432.
3. Bozzo L, Machado MAN, Almeida OP, et al. Hereditary gingival fibromatosis: report of three cases. *J Clin Pediatr Dent* 2000;25:41-46.
4. Gorlin RJ, Cohen MM, Levin LS. *Syndromes of the head and neck*, 3rd edn. New York: Oxford University Press; 1990: 847-858.
5. Horning GM, Fisher JG, Barker F, et al. Gingival fibromatosis with hypertrichosis. *J Periodontol* 1985;56:344-347.
6. Cuestas-Carneiro R, Bornancini C.A. Hereditary generalized gingival fibromatosis associated with hypertrichosis: report of five cases in one family. *J Oral Maxillofac Surg* 1988;46:415-420.
7. Araiche M, Brode H. A case of fibromatosis gingivae. *Oral Surg* 1959;12:1307-1310.
8. Ramon Y, Berman W, Bubis JS. Gingival fibromatosis combined with cherubism. *Oral Surg* 1967;24:435-448.
9. Hartsfield JK, Bixler D, Hazen RH. Gingival fibromatosis with sensorineural hearing loss: an autosomal dominant trait. *Am J Med Genet* 1985;22:623-627.
10. Nevin NC, Scally BG, Kernohan DC, et al. Hereditary gingival fibromatosis. *J Ment Defic Res* 1971;15:130-135.

- 11.Skrinjaric I, Bacic M. Hereditary gingival fibromatosis: report on three families and dermatoglyphic analysis. *J Periodontol Res* 1989;24:303-309.
- 12.Emerson TG. Hereditary gingival fibromatosis: a family pedigree of four generations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;19:1-9.
- 13.Jorgensen RJ, Cocker ME. Variation in the inheritance and expression of gingival fibromatosis. *J Periodontol* 1974;45:472-477.
- 14.Raeste A-M, Collan Y, Kilpinen E. Hereditary fibrous hyperplasia of the gingiva with varying penetrance and expressivity. *Scand J Dent Res* 1978;86:357-365.
- 15.Fletcher JP. Gingival abnormalities of genetic origin: a preliminary communication with special reference to hereditary generalized gingival fibromatosis. *J Dent Res* 1966;45:597-612.
- 16.Günhan O, Gardner DG, Bostanci H, et al. Familial gingival fibromatosis with unusual histologic findings. *J Periodontol* 1995;66:1008-1011.
- 17.Shirasuna K, Okur M, Watatani K, et al. Abnormal cellular property of fibroblasts from congenital gingival fibromatosis. *J Oral Pathol* 1989;7:381-385.
- 18.Tipton DA, Howell KJ, Dabbous MK. Increased proliferation, collagen, and fibronectin production by hereditary gingival fibromatosis fibroblasts. *J Periodontol* 1997;68:524-530.
- 19.Tipton DA, Dabbous MK. Autocrine transforming growth factor beta stimulation of extracellular matrix production by fibroblasts from fibrotic human gingiva. *J Periodontol* 1998;69:609-619.

- 20.Coletta RD, Almeida OP, Reynolds MA, et al. Alteration in expression of MMP-1 and MMP-2 but not TIMP-1 and TIMP-2 in hereditary gingival fibromatosis is mediated by TGF- β 1 autocrine stimulation. *J Periodontol Res* 1999;34:457-463.
- 21.Coletta RD, Almeida OP, Ferreira L, et al. Increase in expression of Hsp47 and collagen in hereditary gingival fibromatosis is modulated by stress and terminal procollagen N-propeptides. *Conn Tis Res*; 1999;40:237-249.
- 22.Coletta RD, Almeida OP, Graner E, et al. Differential proliferation of fibroblasts cultured from hereditary gingival fibromatosis and normal gingiva. *J Periodontol Res* 1998;33:469-475.
- 23.Martelli-Junior H, Bolzani G, Graner E, et al. Microscopic and proliferative comparison of gingival fibroblasts from patients with normal gingiva and with hereditary gingival fibromatosis. *Pesq Odont Bras* 2000;14:123-129.
- 24.Johnson BD, El-Guindy M, Ammons WF, et al. A defect in fibroblasts from an unidentified syndrome with gingival hyperplasia as the predominant feature. *J Periodontol Res* 1986;21:403-413.
- 25.Anderson TJ, Lap CA, Billman MA, et al. Effects of transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor on human gingival fibroblasts grown in serum-containing and serum-free medium. *J Clin Periodontol* 1998;25:48-55.
- 26.Dennison DK, Vallone DR, Pinero GJ, et al. Differential effect of TGF- β 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *J Periodontol* 1994;65:641-648.

27. Okuda K, Murata M, Sugimoto M, et al. TGF-beta1 influences early gingival wound healing in rats: an immunohistochemical evaluation of stromal remodeling by extracellular matrix molecules and PCNA. *J Oral Pathol Med* 1998;27:463-469.
28. Chatterjee R, Mukhopadhyay D, Chakraborty RN, et al. Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in oral carcinomas in relation to human papillomavirus infection and cytokeratins. *J Oral Pathol Med* 1997;26:310-314.
29. Le Roy C, Leduque P, Yuan LJ, et al. Antisense oligonucleotides targeting the transforming growth factor β 1 increases expression of specific genes and functions of Leydig cells. *Eur J Biochem* 1998;257:506-514.
30. Chomezynshi P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
31. Kanto T, Takehara T, Katayama K, et al. Neutralization of transforming growth factor β 1 augments hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte induction in vitro. *J Clin Immunol* 1997;17:462-471.
32. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994;17:914-921.
33. Oikarinen K, Salo T, Käär M-L, et al. Hereditary gingival fibromatosis associated with growth hormone deficiency. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1990;28:335-339.

34. Hassell TM, Cooper GC. Phenytoin-induced gingival overgrowth in mongrel cat model. In: Hassell TM, Johnson MC and Dudley KH, eds. *Phenytoin-Induced Teratology and Gingival Pathology*, New York: Raven Press, 1980: 147-162.
35. Phipps RP, Borrello MA, Blieden TM. Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. *J Periodontol Res* 1997;32:159-165.
36. Hart TC, Pallos D, Bowden DW, et al. Genetic linkage of hereditary gingival fibromatosis to chromosome 2p21. *Am J Hum Genet* 1998;62:876-883.
37. Xiao S, Wang X, Qu B, et al. Refinement of the locus for autosomal dominant hereditary gingival fibromatosis (GINGF) to a 3.8-cM region on 2p21. *Genomics* 2000;68:247-252.
38. Hart TC, Pallos D, Bozzo L, et al. Evidence of genetic heterogeneity for hereditary gingival fibromatosis. *J Dent Res* 2000;79:1758-1764.
39. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994;8:133-146.
40. Alevizopoulos A, Dusserre Y, Ruegg U, et al. Regulation of the transforming growth factor beta-responsive transcription factor CTF-1 by calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV. *J Biol Chem* 1997;272:23597-23605.
41. Klim Y, Ratziu V, Choi SG, et al. Transcriptional activation of transforming growth factor beta1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1. Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. *J Biol Chem* 1998;273:33750-33758.

Send reprint requests to: Dr. Ricardo D. Coletta, Discipline of Oral Pathology, University of Campinas Dental School, CP 52, CEP 13414-018 Piracicaba, São Paulo, Brazil. Fax: +55-19-4305218; e-mail: coletta@fop.unicamp.br

TABLES**Table 1.**

Mean number of AgNOR dots per nucleus and mitotic index in NG and HGF. Mitotic index represent the number of cells in mitosis per field.

	NG	HGF
Number of NORs/nucleus	3.14 \pm 0.43	3.32 \pm 0.27*
Mitosis/field	1.85 \pm 0.93	3.21 \pm 0.76**

* P<0.05; ** P<0.0001

Table 2.

BrdU-labeling and PCNA indexes of fibroblasts from NG and HGF groups. The data of BrdU-labeling and PCNA indexes correspond the percentage of positive cells of 12 strains of fibroblasts.

	BrdU (%)	PCNA (%)
NG	14.31 \pm 7.56	18.01 \pm 10.35
HGF	26.09 \pm 4.70*	25.91 \pm 8.87**

* P<0.0001; ** P<0.01

Table 3.

Effect of antisense oligonucleotides on HGF cell proliferation. HGF fibroblasts were seed in 8-well chamber slides in DMEM with 10% FBS to culture for 24 h and replaced with serum-free medium. After 24 h incubation, 1 µg/ml of antisense or sense oligonucleotides were administered. The proliferation rate was determined by BrdU-labeling and PCNA indexes. Values are the mean ± SD from triplicate determinations.

	BrdU (%)	PCNA (%)
Sense oligonucleotides	14.57 ± 6.60	8.99 ± 3.88
Antisense oligonucleotides	8.84 ± 0.87*	3.40 ± 1.33*

* P<0.05

Table 4.

Percent distribution of cells in cell cycle phases after oligonucleotides treatment. Data are the mean percent for three determinations ± SD.

	Cell Cycle Phases		
	G _{1/0}	S	G _{2/M}
Sense oligonucleotides	89.45 ± 3.58	6.57 ± 2.49	3.97 ± 2.22
Antisense oligonucleotides	91.40 ± 4.24	4.99 ± 3.24	3.60 ± 1.56

Table 5.

Partial reversion of effect of antisense oligonucleotides on HGF fibroblasts proliferation by addition of exogenous TGF- β 1. HGF fibroblasts were cultured in presence the both 1 μ g/ml of antisense oligonucleotides and 0.1 ng/ml of TGF- β 1. The partial reversed showed that TGF- β 1 pathway is independent of treatment with antisense oligonucleotides.

	Control	Antisense oligonucleotides	TGF- β 1 + Antisense oligonucleotides
BrdU (%)	34.56 \pm 15.31	24.44 \pm 14.47	23.65 \pm 14.22
PCNA (%)	47.99 \pm 19.90	33.23 \pm 18.09	38.91 \pm 20.18

Figure Legends

Figure 1.

Effect of TGF- β 1 on NG fibroblast proliferation. NG proliferation was determined by BrdU incorporation into DNA (A) and PCNA immunohistochemical expression (B). Serum-starved cells were cultured in presence of 0.1 ng/ml of TGF- β 1 for 24 h. * P<0.05.

Figure 2.

Proliferation analysis of HGF fibroblasts after addition of anti-TGF- β 1 neutralizing antibodies. HGF2 and HGF5 fibroblasts were grown for 24 h in presence of 5 μ g/ml of anti-TGF- β 1. Following treatment, BrdU-labeling (A) and PCNA (B) indexes were determined. Addition of anti-TGF- β 1 antibodies revealed a decrease in the proliferation rate of HGF fibroblasts. * P<0.05.

FIGURE 1.

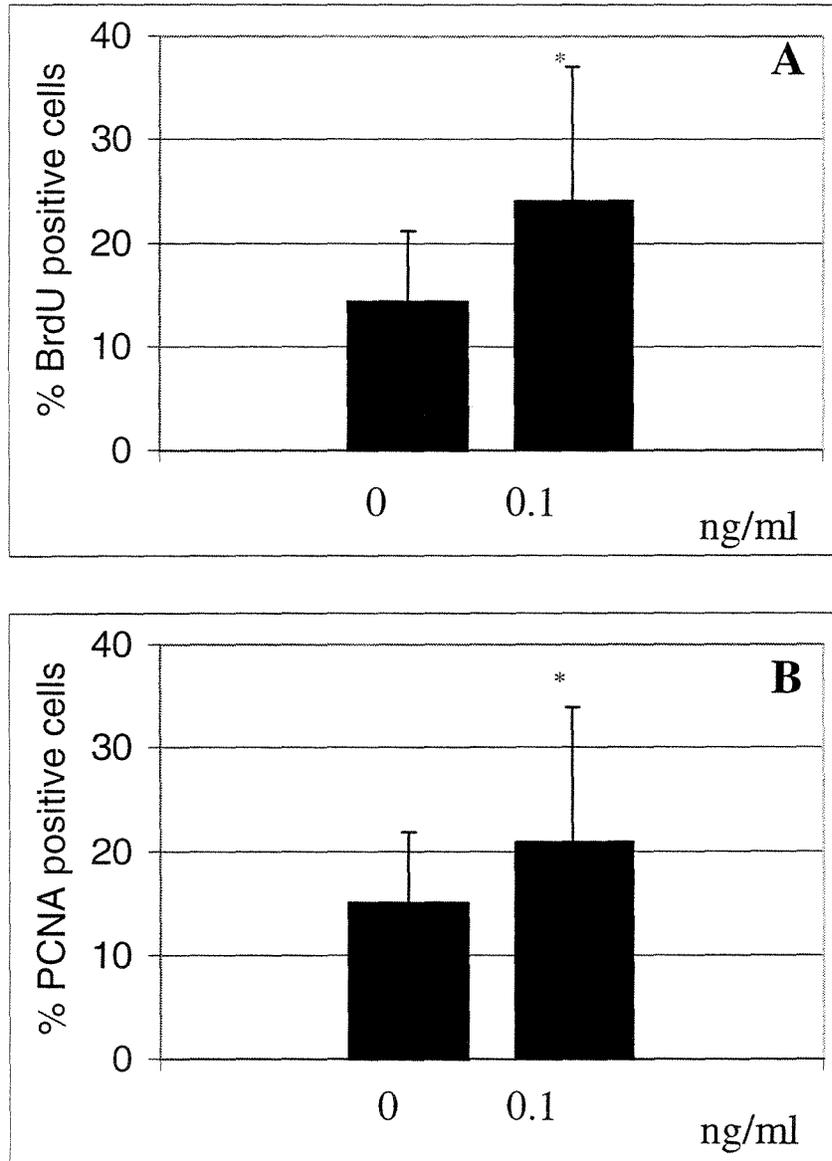


FIGURE 2.

