

CÍNTIA DE SOUZA ALFERES ARAÚJO

200205844

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E EXPRESSÃO DO
RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO
E DO ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO
CELULAR EM FIBROMATOSE GENGIVAL HEREDITÁRIA**

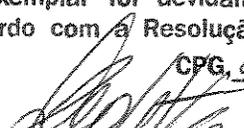
Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
título de Mestre em Estomatopatologia,
área de Patologia.

PIRACICABA
2001

CÍNTIA DE SOUZA ALFERES ARAÚJO

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E EXPRESSÃO DO
RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO
E DO ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO
CELULAR EM FIBROMATOSE GENGIVAL HEREDITÁRIA**

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

CPG, 21/11/2001

Assinatura do Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
título de Mestre em Estomatopatologia,
área de Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Della Coletta
Prof. Dr. Ronaldo Maia Melhado
Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas

**PIRACICABA
2001**

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	Ar15a
	Ar15a
V. Ex.	
TOMPO BC/	47412
PROC.	83.7/02
D	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	2811,00
DATA	04 - 02 - 02
N.º CPD	

CM00163053-7

Ficha Catalográfica

Ar15a Araújo, Cíntia de Souza Alferes.
 Análise histomorfométrica e expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico e do antígeno nuclear de proliferação celular em fibromatose gengival hereditária. / Cíntia de Souza Alferes
 Araújo. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2001.
 xii, 81f. : il.

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

1. Tecidos – Análise. 2. Gengiva – Doenças. 3. Proliferação celular. 4. Epitélio. 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 14 de Setembro de 2001, considerou a candidata CÍNTIA DE SOUZA ALFERES ARAÚJO aprovada.

1. Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

2. Prof. Dr. RONALDO MAIA MELHADO

3. Prof. Dr. PABLO AGUSTIN VARGAS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade.

É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto”.

Albert Einstein

Dedicatória

A Deus,

*Por ter iluminado os caminhos em minha vida
e me amparado nos momentos que dele precisei.*

*Aos meus pais Adalberto Almeida de Souza e Elcimar Alferes de Souza,
por serem exemplos de luta, carinho e dedicação a seus filhos e por serem os
principais incentivadores na busca de meus ideais.*

*Ao meu amado marido, Alécio Madeira de Araújo,
pelo seu amor, paciência e por ser o alicerce de minha vida.*

*Aos meus irmãos Adalberto Alferes de Souza e Wanessa de Souza Guerrer,
pelo carinho, amizade e companherismo que me ajudaram a vencer esta luta.*

Dedicatória

Ser mestre está muito além daquilo que os livros podem nos transmitir.

Ser mestre é ser paciente, é ser motivo de inspiração a quem se ensina.

Ser mestre é saber ouvir e falar certo na hora certa.

É vibrar com a vitória dos seus.

É de forma sutil sempre dar um jeito nos problemas.

*Assim, dedico este trabalho ao **Professor Dr. Ricardo Della Coletta** que se mostrou um grande exemplo de mestre, e a quem não posso deixar de agradecer pela orientação e confiança.*

Agradecimentos Especiais

Ao *Professor Dr. Ronaldo Maia Melhado*, Diretor do Instituto Superior de Ciências e Técnicas Odontológicas da UNIPAR, pelo exemplo de sabedoria, amizade e caráter. Por ser meu conselheiro nos momentos em que mais precisei de palavras certas e inspiração para que seguisse os caminhos da Patologia.

À *doutoranda Karina Gottardello Zecchin* por ser uma pessoa de raro valor e que teve expressivo papel na realização deste trabalho. A você minha “irmã” faltam-me palavras para agradecer por tudo que fizestes por mim.

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP**, na pessoa do diretor **Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum**.

À **Universidade Paranaense - UNIPAR** na pessoa do Magnífico Reitor **Dr. Cândido Garcia**, pelo investimento em minha capacitação docente.

Ao professor **Dr. Oslei Paes de Almeida**, mestre sábio, exemplo de dedicação e dignidade, a quem não posso silenciar meu reconhecimento.

Aos professores doutores **Pablo Agustin Vargas, Márcio Ajudarte Lopes, Heron Fernando Gonzaga e Luiz Carlos Spolidório** pela contribuição inestimável para o meu desenvolvimento científico.

À **Professora Marina Gimenes**, Diretora do Campus Umuarama da UNIPAR, pela amizade e por ter me feito acreditar “que sempre há uma luz no fim do túnel”.

Ao **Professor Dr. Márcio Grama Hoepfner**, Coordenador do Curso de Odontologia da UNIPAR - Umuarama, pelo conhecimento transmitido, amizade sincera e por sempre estar pronto a me ouvir nos momentos que mais precisei falar.

Aos **Professores** da Disciplina de Periodontia da UNIPAR, **Dr. Fábio André dos Santos, Laerte Luiz Bremm e Flávio Roberto Justo**, mestres e

amigos, que me apoiaram e incentivaram a galgar a carreira universitária, transmitindo ensinamentos e experiências de grande valia para a minha vida profissional.

Aos **Professores Heloísa Augusto Melhado e Renato Sader Videira**, por serem meus verdadeiros amigos nas horas boas e difíceis.

Aos meus amigos **André Luiz Lux Klein, Daniela de Cássia Faglione Boleta, Rosana Aramaki Tanaka e Andresa Carla Obici**, pela amizade e por tornarem mais amenos as árduas horas enfrentadas na estrada.

Aos funcionários da Patologia **Adriano Luiz Martins, João Vasconcelos Gomes da Silva Júnior, Maria Helena de Peron** e em especial a **Ana Cristina do Amaral Godoy** pelo auxílio na realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

À **Ana Paola Cotrim Zuniga** por ter me estendido a mão quando precisei, e por me ensinar a realizar a técnica de imunohistoquímica primordial para a realização deste trabalho.

Ao meu cunhado **Eduardo José Guerrer** e meus sobrinhos **Isabela e Luiz Eduardo** pelo carinho a mim dedicado.

Aos meus colegas de pós-graduação **Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel, Karina Antunes Neves, Cláudio Maranhão Pereira, Danyel Elias da Cruz Perez, Marcelo Donizetti Chaves, Paulo Rogério Faria e Fábio Pacheco Muniz Castro Souza** pelos bons momentos que passamos juntos.

Aos colegas **Silvana Pasetto, Fábio Ramôa Pires e Cleverton Roberto de Andrade** por terem contribuído de forma direta para a realização deste trabalho.

As minhas queridas amigas **Belkys Del la Cruz, Kira Singh, Blanca Liliana Torres de León, Léia Maria Bezerra de Menezes, Emilena Lima , Cristina Lourenço, Isa Almeida** e em especial **Marlene Razera** por compartilharem comigo risos e lágrimas.

À todos os meus familiares, em especial aos meus avós, que me incentivaram a lutar por meus ideais.

Às minhas amigas **Juliana Bosso Camargo, Maria Amélia Lonardoni, Maria Helena de Medeiros e Iessa Martins** pela amizade e por mesmo distantes se fazerem presentes.

Aos meus amigos **Sueli Crepaldi Seviero e Cláudio Rogério Seviero** pelos bons momentos que tornaram mais fácil a conclusão desta etapa.

Ao engenheiro agrônomo **Marcelo Corrêa Alves** pela realização da análise estatística deste trabalho.

Aos demais colegas do curso de pós-graduação pelo convívio agradável durante o curso e a todos aqueles que não foram citados mas de uma forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho. Minha gratidão.

Sumário

1. Lista de Ilustrações	01
2. Resumo	03
3. Abstract	05
4. Introdução	07
5. Revisão da Literatura	10
5.1. Fibromatose Gengival Hereditária	10
5.2. Fator de Crescimento Epidérmico e seu receptor celular	22
6. Proposição	29
7. Materiais e Métodos	30
8. Resultados	36
8.1. Características Histológicas	36
8.2. Análise Histomorfométrica	41
8.3. Expressão do receptor de EGF	42
8.4. Expressão de PCNA	48
8.5. Correlação da expressão imunohistoquímica entre o receptor de EGF e PCNA	54
9. Discussão	56
10. Conclusões	64
11. Referências Bibliográficas	65

1. Lista de Ilustrações

Tabela 1. Principais síndromes associadas a FGH.	21
Tabela 2. Classificação utilizada para determinar a positividade de marcação imunohistoquímica.	34
Tabela 3. Classificação utilizada para determinar a intensidade de reação imunohistoquímica.	34
Figura 1. Aspecto histológico do tecido gengival FGH.	37
Figura 2. Fotomicroscopia do tecido conjuntivo de FGH.	38
Figura 3. Fotomicroscopia do tecido epitelial de FGH.	39
Figura 4. Aspecto histológico do tecido de GN .	40
Tabela 4. Análise morfométrica do epitélio dos grupos de GN e FGH.	42
Figura 5. Expressão imunohistoquímica do receptor de EGF em GN .	43
Figura 6. Expressão imunohistoquímica do receptor de EGF em FGH.	44
Tabela 5. Positividade de marcação para o receptor de EGF e PCNA por camadas epiteliais em GN e FGH.	46
Tabela 6. Intensidade de reação para o receptor de EGF e PCNA por camadas epiteliais em GN e FGH.	47
Tabela 7. Correlação entre a positividade de marcação e intensidade de reação para o receptor de EGF.	48

Tabela 8. Correlação entre positividade de marcação e a intensidade de reação para PCNA.	49
Figura 7. Expressão imunohistoquímica de PCNA no epitélio de GN.	50
Figura 8. Maior aumento da fotomicroscopia do PCNA em GN.	51
Figura 9. Expressão imunohistoquímica de PCNA no epitélio de FGH.	52
Figura 10. Maior aumento da fotomicroscopia do PCNA em FGH.	53
Tabela 9. Correlação entre a expressão imunohistoquímica do receptor de EGF e PCNA.	55

Resumo

A fibromatose gengival hereditária (FGH) é uma doença bucal incomum, caracterizada por um aumento gengival generalizado e progressivo. Histologicamente, a FGH apresenta um epitélio com profundas criptas epiteliais que se projetam em direção ao tecido conjuntivo subjacente, que é denso e rico em fibras colágenas. O objetivo do estudo foi analisar o padrão histomorfométrico e a expressão imunohistoquímica do receptor para o fator de crescimento epidérmico (EGF) e do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) em 10 amostras de FGH e 10 de gengiva normal (GN). Os resultados da análise histomorfométrica demonstraram que o perímetro epitelial e a profundidade das criptas epiteliais são significativamente maiores em FGH quando comparado com GN ($p < 0,01$). Embora a área epitelial tenha sido maior em FGH, esta diferença não foi estatisticamente significativa. A expressão do receptor para EGF foi detectada nas camadas basal, espinhosa e granulosa do epitélio de todas as amostras de GN e FGH, com uma porcentagem de células positivas significativamente maior em GN ($p < 0,005$). A expressão de PCNA foi localizada principalmente nas camadas basal e espinhosa do epitélio das amostras de GN e FGH, sem diferenças

significantes. Estes resultados sugerem que a expressão do receptor de EGF está inversamente relacionada à profundidade e irregularidade das criptas epiteliais da gengiva de pacientes com FGH.

Palavras chave: fibromatose gengival hereditária; histomorfometria; receptor do fator de crescimento epidérmico; proliferação.

2. Abstract

Histomorphometric analysis and expression of epidermal growth factor receptor and proliferative cell nuclear antigen in hereditary gingival fibromatosis.

Hereditary gingival fibromatosis (HGF) is an uncommon buccal disease, clinically characterized by a generalized and progressive enlargement of the gingiva. Histologically, HGF shows an epithelium with long slender rete pegs that extend into a dense connective tissue that is rich in collagens fibers. The aim of the present study was to analyze the histomorphometric features and the immunohistochemistry expression of the epidermal growth factor receptor (EGFr) and proliferative cell nuclear antigen (PCNA) in 10 samples of the HGF and 10 of normal gingiva (NG). The results from the histomorphometry demonstrated that the epithelial perimeter and the deep of the epithelial rete pegs are significantly higher in HGF when compared with NG ($p < 0,01$). Although the epithelial area had been higher in HGF, this difference was not statistically significant. The expression of EGFr was observed in all epithelial layers of NG and HGF, with a percentage of positive cells significantly higher in NG group ($p < 0,005$). PCNA expression was

restricted for basal and suprabasal layers of the epithelium of the NG and HGF samples, without significant differences. These results suggest that the expression of EGFr is inversely related to the deep and irregularity of the epithelial rete pegs of gingiva of patients with HGF.

Key words: hereditary gingival fibromatosis; histomorphometry; epidermal growth factor receptor; proliferation.

3. Introdução

A FGH é uma doença bucal rara caracterizada por um aumento gengival fibrótico de crescimento lento e contínuo que envolve a região da maxila e mandíbula (BOZZO *et al.*, 1994). Pode se apresentar como uma alteração isolada, ou ainda em associação com outras anormalidades, como parte de uma síndrome (EMERSON, 1965, FLETCHER, 1966). Histologicamente a FGH caracteriza-se por apresentar um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado mostrando profundas criptas que se projetam em direção ao tecido conjuntivo subjacente e, que por vezes podem se anastomosar (JONHSON *et al.*, 1986; SINGER *et al.*, 1993). O tecido conjuntivo é denso, e rico em fibras colágenas permeados por fibroblastos, vasos sanguíneos e, ocasionalmente, discreto infiltrado inflamatório (REDMAN *et al.*, 1985 SHIRASUNA *et al.*, 1989a; DANESH-MEYER & HOLBOROW, 1993). A FGH é transmitida de forma heterogênea, podendo ser herdada como um padrão autossômico dominante ou recessivo (GORLIN, *et al.*, 1990; GOLDBLATT & SINGER, 1992). Apesar de ter sido demonstrado que o fator de crescimento transformante- β 1 (TGF- β 1) tem papel importante na regulação na proliferação de fibroblastos e na regulação da matriz extracelular (MEC)

em FGH, o mecanismo pelo qual o aumento gengival ocorre ainda é desconhecido (COLETTA *et al.*, 1999a; ANDRADE, 2001).

O fator de crescimento epidérmico (EGF) é um polipeptídeo de 53 aminoácidos o qual foi originalmente isolado do extrato da glândula submandibular de ratos adultos. A primeira função associada a este fator de crescimento foi à capacidade de induzir a abertura precoce das pálpebras e a erupção prematura dos dentes incisivos de ratos (COHEN, 1962). O EGF exerce uma variedade de funções biológicas, sendo uma das principais a capacidade de estimulação da proliferação de células epiteliais e mesenquimais (COHEN, 1962; CARPENTER, 1987), incluindo as células do epitélio oral (STEIDLER & READE, 1980). Estudos de cultura de células demonstraram ser o EGF um potente mitógeno para muitos tipos celulares de origem ectodermal, mesodermal e endodermal (CARPENTER & COHEN, 1979; SCHOUR & MASSLER, 1971), exercendo diversas funções durante a diferenciação celular (FOX *et al.*, 1982; CARPENTER, 1987). Estudos *in vitro* têm claramente mostrado que a ação biológica do EGF requer a associação com o receptor específico de superfície celular (CARPENTER & COHEN, 1979). A partir desses achados iniciais, muitos estudos têm sido realizados no intuito de caracterizar a distribuição imunohistoquímica de EGF

e de seu receptor nos mais diversos tecidos dentre eles os tecidos orais. O objetivo deste trabalho é avaliar o padrão histomorfométrico do tecido epitelial da GN e FGH e determinar a expressão imunohistoquímica do receptor de EGF e PCNA.

4. Revisão da Literatura

5.1. Fibromatose Gengival Hereditária (FGH):

Fibromatose gengival é a denominação usada clinicamente para identificar um aumento volumétrico dos tecidos gengivais decorrente do acúmulo excessivo de colágeno e da proliferação acentuada de fibroblastos (TAKAGI *et al.*, 1991). De acordo com sua natureza, as fibromatoses gengivais têm sido classificadas em medicamentosa, idiopática, inflamatória, hereditária e anatômica (TOMMASI, 1998; CASTRO, 2000). A fibromatose gengival de caráter hereditário é denominada FGH.

A FGH foi inicialmente relatada por GROSS (1856). A partir deste relato, foram publicados inúmeros trabalhos caracterizando clínica, bioquímica, histológica e geneticamente esta alteração. A FGH é uma doença bucal relativamente incomum, com distribuição de 1 em 750.000 indivíduos (FLETCHER, 1966; SINGER *et al.*, 1993; RAMER *et al.*, 1996), caracterizada pelo aumento gengival fibrótico, com crescimento lento e contínuo, não hemorrágico, de coloração rósea e pontilhado superficial característico, que pode envolver a região da maxila e mandíbula. Esta doença não apresenta regressão espontânea e nem predileção por sexo (SCIUBBA &

NIBLOOM, 1986; BOZZO, 1992; 1994; TRIPTON, 1997, RUSHTON, 1957). O aumento pode ser generalizado ou parcial, isto é, envolve somente um arco ou porções de um arco (CUESTAS-CARNERO, 1988) sendo, neste caso, freqüente o envolvimento da superfície palatina da tuberosidade maxilar e da superfície lingual da mandíbula (OIKARINEN *et al.*, 1990; COLETTA, 1999a).

A gravidade da FGH é variável, produzindo desde um defeito estético (BAKAEEN & SCULLY, 1991) até, em casos mais graves, deformidades no contorno do palato, alterando a fonação, deglutição e mastigação (CUESTAS-CARNERO, 1988; BOZZO, 1994). Esta variação clínica é possivelmente explicada pela variável expressividade gênica da doença.

As manifestações clínicas da FGH são freqüentemente observadas durante as fases de erupção dos dentes permanentes, mas podem ser observadas com a erupção da dentição decídua e raramente estarem presentes ao nascimento. FLETCHER (1966) afirmou que o aumento gengival em pacientes com FGH aparece e progride durante as fases de erupção dental e diminui com o final destes estágios. Este autor também afirmou que a presença de dentes é necessária para que a FGH se desenvolva, visto que esta alteração não é observada antes da erupção dental e desaparece ou regride com

a perda dos dentes. Contudo, inúmeros trabalhos têm descrito a presença do crescimento gengival em períodos curtos após o nascimento e observado o crescimento em pacientes desdentados (HINE, 1952; MCINDOE & SMITH, 1958; RUGGLES, 1925). Na família de pacientes com FGH utilizada neste estudo, a FGH apresenta um padrão de manifestação heterogêneo, sendo em alguns pacientes observada em períodos após o nascimento e em outros nas fases de erupção da dentição decídua ou permanente (BOZZO *et al.*, 2000).

A FGH usualmente é encontrada como uma alteração isolada (EMERSON, 1965; FLETCHER, 1966), mas pode apresentar-se também em associação com outras anormalidades, caracterizando uma síndrome. A característica sindrômica mais freqüentemente observada em associação com a FGH é a hipertricose, que está ocasionalmente associada com retardo mental e epilepsia. As principais síndromes que apresentam a FGH como uma característica são descritas na tabela 1. Os membros da família acompanhada por nós não apresentam nenhuma das características comumente observadas em associação a FGH e apresentam intelecto normal.

A FGH é transmitida de forma heterogênea, podendo ser herdada como um padrão autossômico dominante ou recessivo (GORLIN, *et al.*, 1990; GOLDBLATT & SINGER, 1993). O padrão recessivo apresenta uma menor

prevalência quando comparado com o padrão dominante e, segundo alguns autores, este padrão provém de casamentos consangüíneos (NEVIN *et al.*, 1971). Porém a consangüinidade não é a única e nem a explicação mais aceita. Descendentes de pessoas não aparentadas, cada qual portador de um gene mutado, parecem ser responsáveis pela maioria dos casos de doenças autossômicas recessivas, principalmente se o caráter recessivo apresentar alta freqüência na população (THOMPSON & THOMPSON, 1993).

O primeiro estudo correlacionando 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 família objeto deste estudo, não confirmaram alinhamento cromossômico similar (HART *et al.*, 2000). Recentemente, XIAO *et al.* (2000), analisando quatro diferentes famílias de portadores 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 das bases genéticas da FGH levará a uma melhor compreensão dos mecanismos

envolvidos e possibilitará melhores perspectivas para tratamentos definitivos nestes pacientes.

A FGH foi descrita microscopicamente pela primeira vez por TOMES (1879), e, desde então, nota-se que há uma certa unanimidade na literatura no que se refere à descrição histológica desta alteração. A FGH se caracteriza histologicamente por apresentar um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, mostrando acantose com profundas criptas que se projetam em direção ao tecido conjuntivo subjacente, e que, por vezes, podem se anastomosar (JOHNSON *et al.*, 1986; SINGER *et al.*, 1993). O tecido conjuntivo é denso com numerosos feixes de fibras colágenas permeados por fibroblastos e vasos sanguíneos (REDMAN *et al.*, 1985; SHIRASUNA *et al.*, 1989; DANESH-MEYER & HOLBOROW, 1993). Foram descritas áreas de calcificação distrófica, ilhas de metaplasia óssea, áreas de ulceração e focos de células inflamatórias presentes em biópsias de pacientes portadores da doença (GÜNHAN *et al.*, 1995). Estudos de microscopia eletrônica do tecido conjuntivo de pacientes portadores de FGH mostraram que as fibras colágenas apresentavam um padrão de dissociação aumentado e variação de seu diâmetro (BARROS, 1991).

Os mecanismos biológicos envolvidos na FGH são pouco conhecidos, e

os resultados obtidos de estudos de culturas celulares ainda são controversos. Algumas evidências experimentais demonstraram que o aumento gengival pode estar relacionado com o metabolismo do colágeno tipo I (JONHSON *et al.*, 1986). Estudos em culturas de células revelaram que fibroblastos derivados de pacientes com FGH demonstraram redução em seu potencial proliferativo e na síntese de colágeno (JONHSON *et al.*, 1986; SHIRASUNA *et al.*, 1989b; OIKARINEN *et al.*, 1990; TRIPTON *et al.*, 1997). Embora tenha sido demonstrado que o efeito autócrino de TGF- β 1 regula a síntese de colágeno por fibroblastos de FGH (TRIPTON & DABBOUS, 1998), os mecanismos relacionados à ativação desta citocina ainda são incertos.

JONHSON *et al.* (1986) em culturas de células 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 das células de FGH. Estes autores também descreveram que a proliferação celular é menor em fibroblastos de FGH. SHIRASUNA *et al.* (1989b) 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 acúmulo excessivo de colágeno tipo I no meio extracelular. OIKARINEN *et al.* (1990) estudando um caso de FGH associado à deficiência da síntese de hormônios do crescimento, descreveram uma baixa taxa de proliferação celular, como descrito por SHIRASUNA *et al.* (1989b), mas em contraste, o nível de produção de RNAm para colágeno dos tipos I e III foi menor nos fibroblastos de FGH. TRIPTON *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 FGH

e GN sejam diplóides, fibroblastos de FGH mostraram uma maior porcentagem de células nas fases S e G2/M do ciclo celular (COLETTA *et al.*, 1999a). Estes 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 $[\alpha 1(I)]_2 [\alpha 2(I)]$ (COLETTA *et al.*, 1999a). Estes resultados são consistentes aos dados da literatura que descreveram os tipos de colágenos e as relações estequiométricas como os mesmos em gengivas normais e hiperplasias gengivais induzidas por drogas ou de origem genética (BECKER *et al.*, 1967; JONHSON *et al.*, 1986).

É inferida a produção local de MEC como causa do aumento gengival de pacientes com FGH e com hiperplasias gengivais induzidas por drogas. Contudo, recentes estudos demonstraram igual importância para os mecanismos que regulam a proliferação celular e a degradação dos componentes da MEC. A degradação da MEC é principalmente realizada por enzimas do grupo das metaloproteinases de matriz (MMPs). Várias evidências existem para a participação das MMPs em processos normais e patológicos, incluindo embriogênese, reparação, inflamação, câncer e doenças fibróticas. A

inibição das MMPs é realizada por membros da família dos inibidores teciduais de MMPs (TIMP). A expressão gênica dessas enzimas 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 (COLETTA *et al.*, 1999b).

Recentemente foi demonstrado que as células de FGH e GN, apesar da diferença de velocidade de crescimento, proliferam em orientação paralela 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. Entretanto, em condições de confluência celular, os fibroblastos de FGH demonstraram tamanho e largura menores que os fibroblastos de GN. A coloração das células pela técnica convencional de H&E e análise de microscopia de luz demonstrou que, a redução no volume celular dos fibroblastos de FGH em condições de confluência celular é resultado da redução de volume citoplasmático, não do

volume nuclear (MARTELLI-JUNIOR *et al.*, 2000).

A FGH não pode ser curada, no entanto 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, fala e para a estética gengival dos pacientes. Com o aumento na quantidade de tecido gengival e início das alterações funcionais, a intervenção cirúrgica é indicada (MARTELLI-JÚNIOR *et al.*, 2000). CUESTAS-CARNERO & 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 da doença, pois esta parece ser a única forma de tratamento definitivo. Pacientes deste estudo recebem um protocolo de tratamento mais conservador, 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 também foi descrita por FLETCHER (1966). Outros métodos de remoção de grandes quantidades de tecido gengival têm sido utilizados tais 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, demonstrou que o grau de hiperplasia gengival não parece associado com a higiene oral ou com a presença de cálculo dental.

Tabela 1. Principais síndromes associadas a FGH.

Síndrome	Herança	Principais características além de FGH
Murray-Puretic-Drescher	Autossômica recessiva	<ul style="list-style-type: none">• Múltiplos fibromas hialinos em cabeça e pescoço• Infecções recorrentes• Osteólise das falanges terminais
Rutherford	Autossômica dominante	<ul style="list-style-type: none">• Retardo na erupção dental• Opacidade da córnea
Zimmermam-Laband	Autossômica dominante	<ul style="list-style-type: none">• Displasia de nariz, orelha e unhas• Hipoplasia das falanges terminais• Hiperflexibilidade das articulações• Hepatoesplenomegalia
Jones	Autossômica Recessiva	<ul style="list-style-type: none">• Progressiva perda da audição
Cross	Autossômica Recessiva	<ul style="list-style-type: none">• Hipopigmentação dérmica• Microftalmia• Retardo Mental
Cowden	Autossômica Recessiva	<ul style="list-style-type: none">• Fibroadenoma gigante de mama• Hipertricose• Múltiplos hamartomas
Fibromatose Gengival	Autossômica dominante ou recessiva	<ul style="list-style-type: none">• Hipertricose• Epilepsia• Retardo Mental

Adaptado de Bakaeen and Scully (1991) e Gorlin *et al.* (1990).

5.2. Fator de Crescimento Epidérmico e seu receptor celular

Os eventos biológicos são, na maioria das vezes, mediados por moléculas polipeptídicas extracelulares sinalizadoras capazes de estimular a proliferação, diferenciação, regeneração, inflamação e a resposta imunológica celular e humoral (ALBERTS *et al.*, 1997). Estas moléculas sinalizadoras são denominadas citocinas e neste grupo incluem os fatores de crescimento, as interleucinas, os intérferons, os fatores citotóxicos e os fatores estimuladores de colônias.

Os fatores de crescimento foram inicialmente descobertos por suas habilidades em estimular células quiescentes a iniciarem o processo de divisão em um meio nutricional completo na presença de soro. Esta observação distingue os fatores de crescimento dos elementos essenciais, cofatores e nutrientes que são utilizados em um processo metabólico, mas que não são suficientes para estimular a divisão de células quiescentes. Os fatores de crescimento são sintetizados e secretados por muitos tipos de células incluindo plaquetas, células inflamatórias, fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais, podendo agir sobre a célula produtora por estimulação autócrina, em células adjacentes por estimulação parácrina, ou em células localizadas a

longas distâncias por estimulação endócrina (BENNETT & SHULTZ, 1993).

O EGF foi originalmente isolado do extrato da glândula submandibular de ratos adultos. A primeira função associada a este fator de crescimento foi à capacidade de induzir a abertura precoce das pálpebras e a erupção dos dentes incisivos de ratos recém nascidos (COHEN, 1962). EGF é um polipeptídeo multifuncional com 53 aminoácidos (aa) de cadeia pequena única com massa molecular de 6045 Da (CARPENTER & COHEN, 1979). Além da glândula submandibular, o EGF tem sido detectado em uma variedade de outros tecidos humanos e de ratos. Dentre estes destacamos, os epitélios de superfície, incluindo o epitélio da mucosa bucal, e as glândulas de Brunner's no duodeno e pâncreas que constituem os principais sítios de EGF no corpo humano (KONTUREK *et al.*, 1989). O EGF pode ainda ser encontrado em secreções corporais como saliva, leite, líquido amniótico e plasma (SHROFF *et al.*, 1995; LEV-RAN & HWANG, 1990) e na placenta (WANG *et al.*, 1988). A família dos fatores de crescimento epidérmicos é formada por, pelo menos, 4 membros, incluindo o EGF propriamente dito, o fator de crescimento transformante- α (TGF α), anfiregulina e EGF ligado a heparina (CARPENTER & COHEN, 1990; WELLS, 1999).

O EGF propriamente dito exerce uma variedade de funções biológicas,

dentre elas a primeira originalmente conhecida é capacidade de estimulação da proliferação de células epiteliais e mesenquimais (COHEN, 1962; CARPENTER, 1987), incluindo as células do epitélio oral (STEIDLER & READE, 1980). Em estudos de cultura de células, o EGF mostrou ser um potente mitógeno para muitos tipos celulares de origem ectodermal, mesodermal e endodermal (CARPENTER & COHEN, 1979; SCHOUR & MASSLER, 1971), influenciando várias funções durante a diferenciação celular (FOX *et al.*, 1982; CARPENTER, 1987). Também estimula a proliferação de células embrionárias em cultura e durante eventos morfogênicos (PARTANEN & THESLEFF, 1987; SCHOUR & MASSLER, 1971). Este fator de crescimento atua como importante regulador da degradação da MEC uma vez que pode estimular a secreção de collagenase, gelatinase e ativadores de plasminogênio em uma variedade de tipos celulares (HAMILTON *et al.*, 1984; MAWATARI *et al.*, 1991; LYONS & BIRKEDAL-HANSEN, 1993). Além disto, exerce um papel na reabsorção óssea (HATA *et al.*, 1988; TURLEY *et al.*, 1985), angiogênese, ativação do sistema imune (PIETRZAK *et al.*, 1997) e na cicatrização de feridas (CARPENTER & COHEN, 1979; LASKIN *et al.*, 1981; KIRISTY *et al.*, 1993; MODEER *et al.*, 1993). Além de tais funções fisiológicas, tem sido

relatado que o EGF apresenta capacidade de promover a indução de tumores em uma variedade de modelos experimentais, incluindo tumores de pele e mama de ratos e tumores pancreáticos e pulmonares de hamsters (ROSE *et al.*, 1976; KURACHI, 1985; MALTI *et al.*, 1987). A expressão aumentada de EGF é comumente observada em carcinomas da região de cabeça e pescoço humano (YAMAMOTO *et al.*, 1986).

Estudos *in vitro* têm claramente demonstrado que a ação biológica do EGF requer a associação com um receptor específico de superfície celular (CARPENTER & COHEN, 1979). O receptor de EGF é uma glicoproteína transmembrânica composta por 1186 aa e massa molecular de 170 kDa (BENETT & SHULTZ, 1993). O receptor possui três regiões principais: o domínio extracelular (composto por 621 aa), que tem sítios de ligação ao fator de crescimento; o domínio transmembrânico (composto por 23 aa) que consiste de aminoácidos hidrofóbicos; e o domínio citoplasmático (composto por 542 aa), que contém um sítio específico de tirosinoquinase (PARTANEM, 1987).

O processo de tradução de sinais a partir de EGF inicia-se com a ligação do fator de crescimento ao domínio extracelular do receptor transmembrânico. Esta ligação promove alterações conformacionais do receptor e conseqüente

ativação do sítio específico de tirosinoquinase presente no domínio citoplasmático, que estimula a fosforilação de diferentes proteínas com função de mensageiro citoplasmático, incluindo a fosfolipase *cyl* e proteínas ativadores de GDP. A ativação dos mensageiros citoplasmáticos promove a síntese das enzimas caseinoquinase II, proteinoquinase C e outras, estimulando a liberação de cálcio do retículo endoplasmático, o aumento no transporte de glucose e aminoácidos e a transcrição de genes requeridos na mitose como o *c-jun* e *c-fos*. Após a ativação do domínio citoplasmático, o complexo receptor-fator de crescimento é internalizado e degradado nos lisossomos (CARPENTER & COHEN, 1990; BENETT & SHULTZ, 1993).

Muitos estudos têm sido realizados no intuito de caracterizar a distribuição imunohistoquímica de EGF e de seu receptor. GREEN *et al.* (1983) determinaram a localização imunohistoquímica de receptores do EGF na pele de ratos usando autorradiografias. Estes autores detectaram os receptores em áreas com alta capacidade proliferativa, incluindo as células epiteliais, glândulas sebáceas e regiões de folículo piloso. POULSEN *et al.* (1986) compararam através de imunohistoquímica a distribuição tecidual do receptor de EGF em ratos e humanos. Estes autores encontraram marcação expressiva em glândulas como as submandibulares, serosas da cavidade nasal,

as de Brunner's no duodeno e em células de Paneth no intestino delgado, em ambos os grupos, sugerindo que o EGF é abundante em células com função exócrina. Os primeiros estudos de identificação do EGF na mucosa bucal compararam as diferenças em sua expressão entre os sexos masculino e feminino. Entretanto, os autores não obtiveram diferença estatisticamente significantes entre as amostras do estudo.

IRWIN *et al.* (1991) analisaram a expressão de receptores de EGF em células epiteliais e do estroma de tecido gengival normal e inflamado através de técnicas de imunohistoquímica. Estes autores demonstraram que o receptor para EGF não é expresso em tecidos normais. Em contraste, é encontrado em grandes quantidades nas células epiteliais e do estroma de tecidos inflamados. O tecido epitelial inflamado exibiu um padrão variável de marcação com intensa positividade nas células das camadas espinhosa, granulosa e córnea e pouca expressão na camada basal. Os resultados deste estudo sugerem que a expressividade de receptores para EGF na superfície celular ocorre durante a resposta inflamatória. Entretanto, estudos posteriores obtiveram resultados diferentes aos encontrados por IRWIN *et al.* (1991). Estes estudos demonstraram que o receptor de EGF foi encontrado em todos os tecidos moles normais da boca. No epitélio gengival foi observada forte distribuição

nas células da camada basal com marcação de membrana plasmática e citoplasma. Uma redução gradativa na marcação do receptor de EGF é observada a partir das células basais tornando-se negativas as células da camada córnea (WHITCOMB *et al.*, 1993). Similarmente NORDLUND *et al.* (1991), analisando a distribuição dos receptores de EGF em epitélio gengival de indivíduos com gengiva normal e com periodontite juvenil, através de métodos de imunohistoquímica, observaram uma expressiva marcação do receptor nas células da camada basal do epitélio gengival de todos os grupos, apresentando negatividade na região de epitélio juncional.

6. Proposição

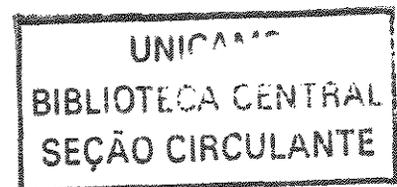
O objetivo deste estudo foi analisar o padrão histomorfométrico e a expressão imunohistoquímica do receptor de EGF e PCNA no epitélio de tecidos gengivais de pacientes com FGH e GN.

7. Materiais e Métodos

Para o presente estudo, 20 amostras de tecido gengival pertencentes aos arquivos do Serviço de Histopatologia da Disciplina de Patologia Bucal da FOP-UNICAMP foram selecionadas. As amostras foram divididas em dois grupos com 10 espécimes cada, sendo um de FGH e outro de GN. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas relativas à ética em pesquisa envolvendo seres humanos - Deliberação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP.

Grupo de FGH: este grupo consistiu de espécimes obtidos através de tratamento cirúrgico de rotina de indivíduos com FGH, membros de uma mesma família. Foram selecionados os tecidos gengivais de pacientes que apresentavam aumento gengival sem evidências clínicas de inflamação, dado que foi posteriormente confirmado através do exame histológico das lâminas.

Grupo GN: as amostras pertencentes a este grupo foram obtidas através de biópsias da papila interdental da região de pré-molares superiores de indivíduos com rígido controle de placa bacteriana, e sem sinais clínicos de inflamação. Nenhum dos pacientes deste estudo relatou o uso de medicamentos relacionados a crescimento gengival.



Para avaliação histoquímica e imunohistoquímica do material previamente fixado em formol tamponado a 10% e embebido em parafina, cortes de 3 ou 5 micrometros (μm) foram estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas com organossilano (Sigma[®]). Os cortes de 5 μm foram corados com a técnica convencional de hematoxilina e eosina (H&E).

Para a análise histomorfométrica, 3 lâminas de cada amostra foram obtidas através de cortes semi-seriados de 5 μm (1 secção a cada 10 secções foi selecionada) e coradas com H&E. A análise dos cortes de FGH e GN foi realizada utilizando o sistema de imagem Zeiss (KONTRON 400). Foram avaliados os seguintes parâmetros histomorfométricos:

- a) Área e perímetro epitelial por centímetro linear de gengiva;
- b) Relação da área e perímetro do tecido epitelial e tecido conjuntivo por cm^2 de gengiva;
- c) Altura das criptas epiteliais.

As reações de imunohistoquímica para receptor de EGF e PCNA foram realizadas utilizando o protocolo baseado no método indireto com sistema de amplificação ABC. Resumidamente, os cortes foram diafanizados em xilol por 30 min em estufa à 37°C e em temperatura ambiente por mais 30 min e, posteriormente, foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol. Os

cortes foram em seguida lavados em água destilada e incubados com solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3% em 5 trocas de 5 min com a finalidade de bloquear a peroxidase endógena.

Para a recuperação antigênica, os cortes histológicos incubados com anticorpo anti-PCNA foram previamente submetidos a tratamento com 10 mM ácido cítrico pH 6,0 e aquecimento no microondas (2 ciclos de 12 min). A recuperação antigênica dos cortes histológicos que receberam incubação com anticorpo anti-receptor de EGF foi realizada pelo tratamento com solução de 0,1% de tripsina (Sigma, Chemical Co, St Louis, MO, USA) em salina tamponada com fosfato (PBS) por 1 h à 37°C. A seguir, os cortes foram incubados com o anticorpo primário por 18h em solução de 1% albumina sérica bovina em PBS. Os anticorpos utilizados neste estudo foram: anti-receptor para EGF humano produzido em camundongos (Dako Corp., Carpinteria, CA, USA) diluído na concentração de 1/25 e anti-PCNA humano produzido em camundongos (Dako Corp.) na concentração de 1/16.000.

Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário conjugado a biotina na diluição de 1/500 por 30 min à 37°C. Após nova lavagem em PBS, os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-biotina na diluição de 1/500

por 30 min à 37°C (Kit Duet – StrepABC Complex/ HRP, Dako Corp.). A reação foi revelada com solução aquosa de diaminobenzidina tetrahydroclorato (Sigma) na concentração de 0,6 mg/ml acrescida de 0,01% de peróxido de hidrogênio e 0,01% dimetil sulfóxido (DMSO). Após lavagem em água corrente, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris. Controles positivos e negativos foram realizados em todas as reações.

As reações imunohistoquímicas foram avaliadas ao microscópio de luz e classificadas quanto à positividade de marcação e intensidade de reação aos anticorpos, analisando a característica predominante em todo o tecido. O índice de positividade de marcação foi expresso como a porcentagem de células positivas através de contagem de 100 células de cada amostra do grupo de FGH e GN, como descrito por PFFEIFER (1996) (Tabela 2). A classificação da intensidade de reação aos anticorpos foi realizada segundo os critérios de WISE *et al.* (1992) (Tabela 3).

Tabela 2. Classificação utilizada para determinar a positividade de marcação dos anticorpos anti-PCNA e anti-receptor de EGF.

Porcentagem de células positivas	Graduação
0%	0
1-49%	1
50-79%	2
80-100%	3

Tabela 3. Classificação utilizada para determinar a intensidade de reação dos anticorpos anti-PCNA e anti-receptor de EGF.

Intensidade de Marcação	Graduação
Negativo	-
Fraco	+
Moderado	++
Forte	+++

Para a análise estatística deste estudo utilizou-se o teste t de Student para a comparação das medidas histomorfométricas entre os grupos e o teste

não paramétrico de Wilcoxon para a comparação da positividade de marcação e intensidade de reação entre os grupos para os anticorpos anti-PCNA e anti-receptor de EGF. O teste de Mantel e Haenszel foi utilizado para analisar a correlação entre a positividade de marcação e intensidade de reação para os anticorpos. Para analisar a correlação entre a expressão dos anticorpos e as medidas histomorfométricas foi utilizado o teste de Sperman. Em todas as análises, $p \leq 0,05$ foi considerado como indicativo de diferença estatisticamente significativa.

8. Resultados

8.1. Características Histológicas:

O tecido gengival removido cirurgicamente dos pacientes com FGH demonstrou um tecido conjuntivo fibroso denso entremeado por fibroblastos e vasos sanguíneos (fig. 1). As fibras colágenas formaram feixes que se distribuía em direções variadas e os fibroblastos apresentaram, com frequência, núcleo grande e ovalado (fig. 2). A superfície gengival apresentou-se recoberta por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. Em algumas áreas notou-se uma camada uniforme de ortoqueratina e as camadas de células granulosa, espinhosa e basal foram bem estruturadas (fig. 3). Uma característica marcante do tecido epitelial foi a presença de profundas, delgadas e, muitas vezes, irregulares criptas epiteliais que se projetam em direção ao tecido conjuntivo subjacente. Nas regiões com criptas epiteliais profundas, o tecido epitelial mostrou-se delgado.

As amostras de tecido gengival normal mostraram típicas características histológicas. A superfície gengival foi recoberta por um epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado suportada por um tecido conjuntivo fibroso com presença de focos discretos de infiltrado inflamatório mononuclear

(fig.4). Comparando com as amostras do grupo de FGH, o tecido gengival do grupo controle mostrou um tecido conjuntivo fibroso menos denso e as criptas epiteliais foram mais curtas e menos numerosas.

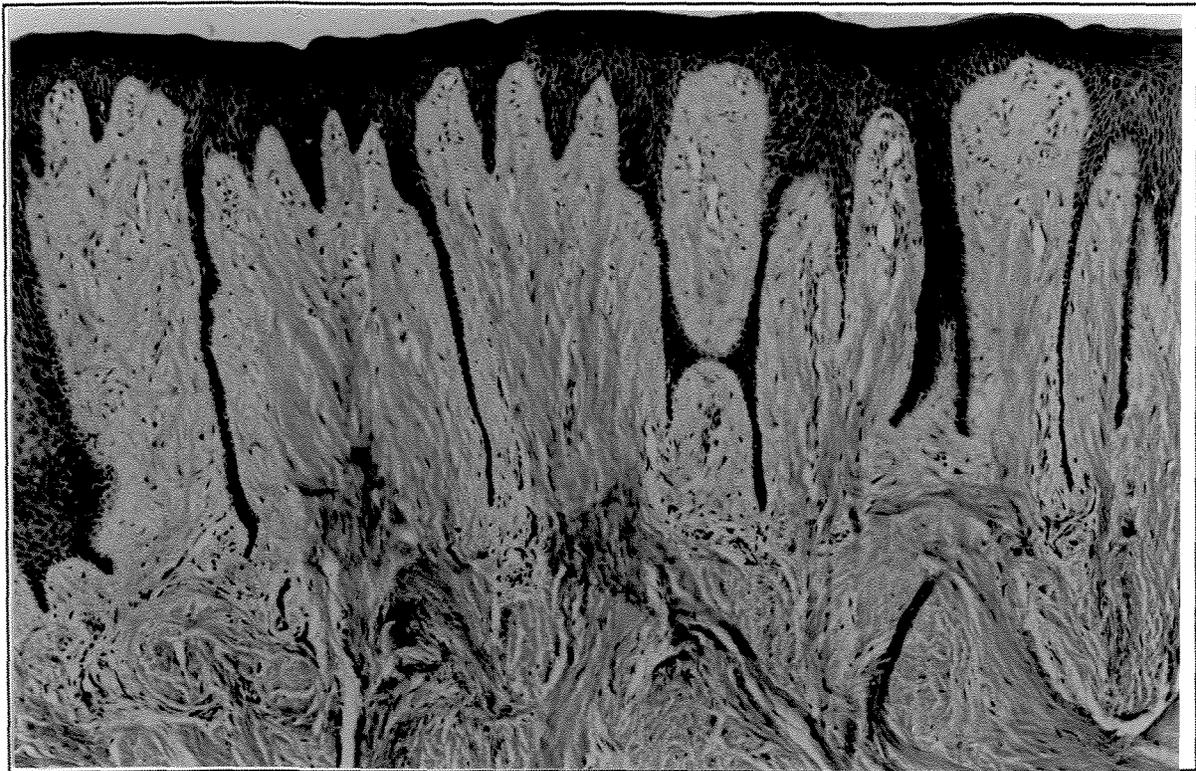


Fig. 1. Aspecto histológico do tecido gengival de uma das amostras de FGH deste estudo. Nota-se um tecido conjuntivo fibroso e denso. O epitélio é pavimentoso estratificado queratinizado com profundas criptas epiteliais. (80x)

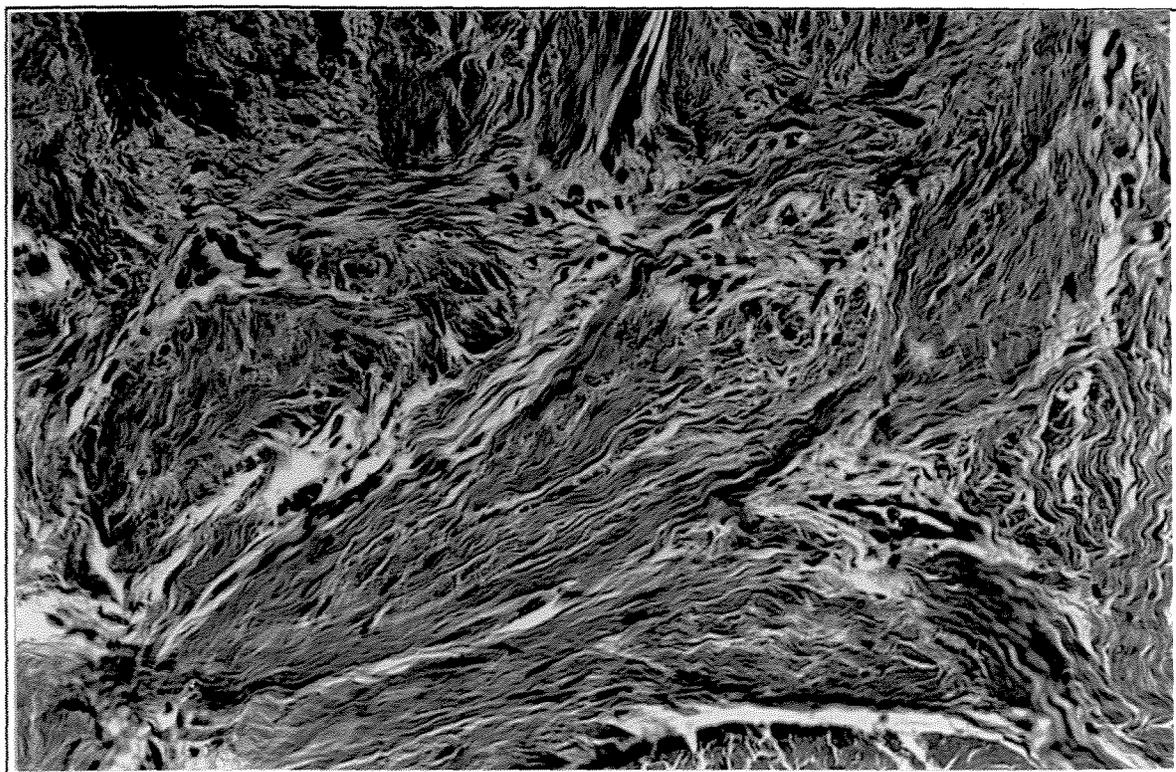


Fig. 2. Fotomicroscopia do tecido conjuntivo de uma das amostras de FGH. Observe a grande quantidade de fibras colágenas dispostas em feixes distribuídas em direções variadas entremeadas por fibroblastos e vasos sanguíneos. (256x)

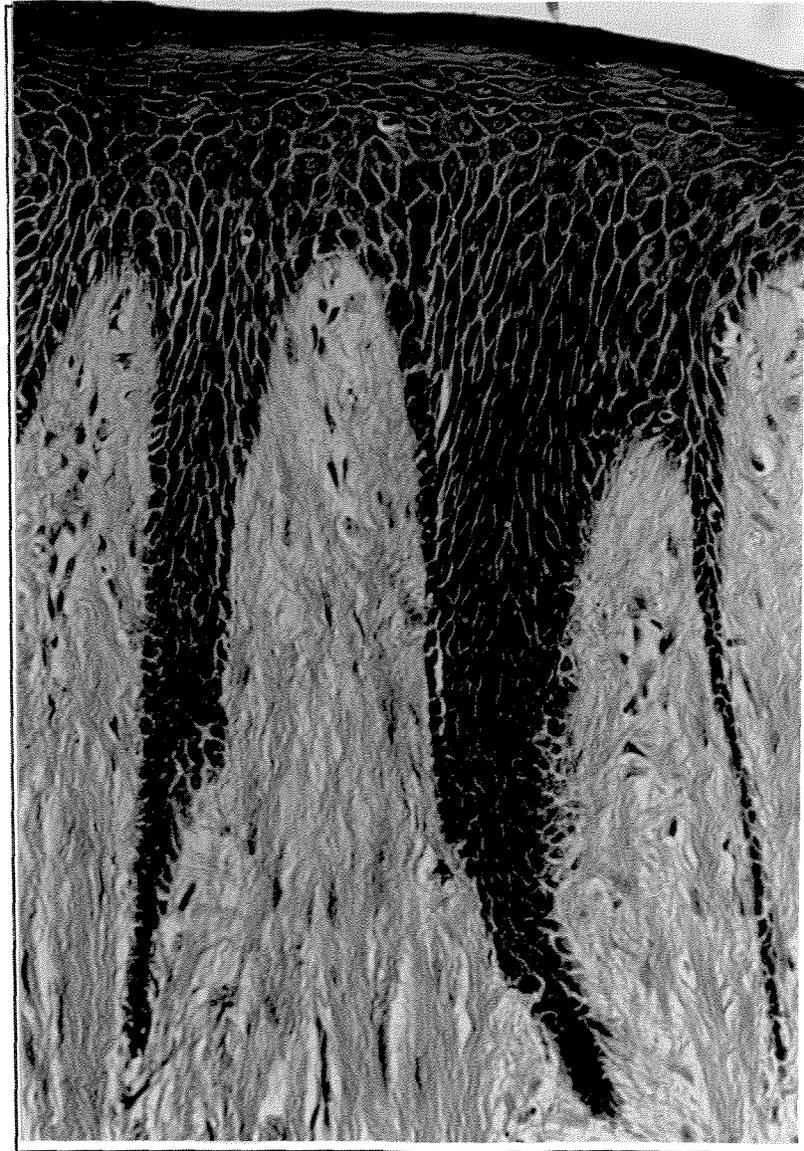


Fig. 3. Fotomicroscopia demonstrando em maior detalhe o tecido epitelial de uma das amostras de FGH. As camadas epiteliais são bem estruturadas e delimitadas. (200x)



Fig. 4. Aspecto histológico de uma das amostras do grupo de GN. Este tecido apresentou típicas características como um epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado suportado por um tecido conjuntivo fibroso. (80x)

8.2. Análise Histomorfométrica:

Os resultados da análise histomorfométrica comparativa do tecido epitelial entre os grupos de GN e FGH são mostrados na tabela 4. Estes resultados mostraram que o perímetro epitelial e a profundidade das criptas epiteliais no grupo de FGH foram significativamente maiores quando comparados ao grupo de GN ($p < 0,005$). Todas as amostras de FGH mostraram um perímetro epitelial maior que a média do grupo de GN. O perímetro epitelial no grupo de FGH variou entre 3108-6564 $\mu\text{m/cm}$ linear de gengiva com uma mediana de 4329,80 $\mu\text{m/cm}$ (média de $4650,23 \pm 1289,35$), enquanto que para o grupo controle variou entre 2404-4681 $\mu\text{m/cm}$ linear de gengiva com uma mediana de 2818,34 $\mu\text{m/cm}$ (média de $3092,21 \pm 671,60$). A média das alturas das criptas epiteliais variou entre 398-526 $\mu\text{m/cripta}$ com uma mediana de 473,24 $\mu\text{m/cripta}$ (média $467,60 \pm 41,80$) para o grupo de FGH e entre 263-439 com uma mediana de 384,34 $\mu\text{m/cripta}$ para o grupo de GN (média $359,09 \pm 64,42$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de GN e FGH em relação à área epitelial por centímetro linear de gengiva e a relação entre área e perímetro do tecido epitelial e do tecido conjuntivo por cm^2 de gengiva (tabela 4).

Tabela 4. Análise morfométrica do tecido epitelial dos grupos de GN e FGH.

Os dados representam a média \pm desvio padrão de 10 amostras para cada grupo.

Variável	GN (μm)	FGH (μm)	P
Perímetro/cm linear	3092,2 \pm 671,6	4650,3 \pm 1289,2	0,005
Área/cm linear	135845 \pm 22832	144753 \pm 29521	0,46
Altura das criptas epiteliais	359,1 \pm 64,42	467,6 \pm 41,79	0,005
Relação da área/cm ²	1,66 \pm 1,30	1,54 \pm 0,51	0,78
Relação do perímetro/cm ²	0,98 \pm 0,08	1,01 \pm 0,06	0,44

8.3. Expressão do receptor de EGF

A expressão do receptor de EGF foi observada nas camadas basal, espinhosa e granulosa de todas as amostras do grupo controle (fig. 5). Nas amostras do grupo de FGH, o receptor para EGF foi detectado apenas nas camadas basal e espinhosa (fig. 6).

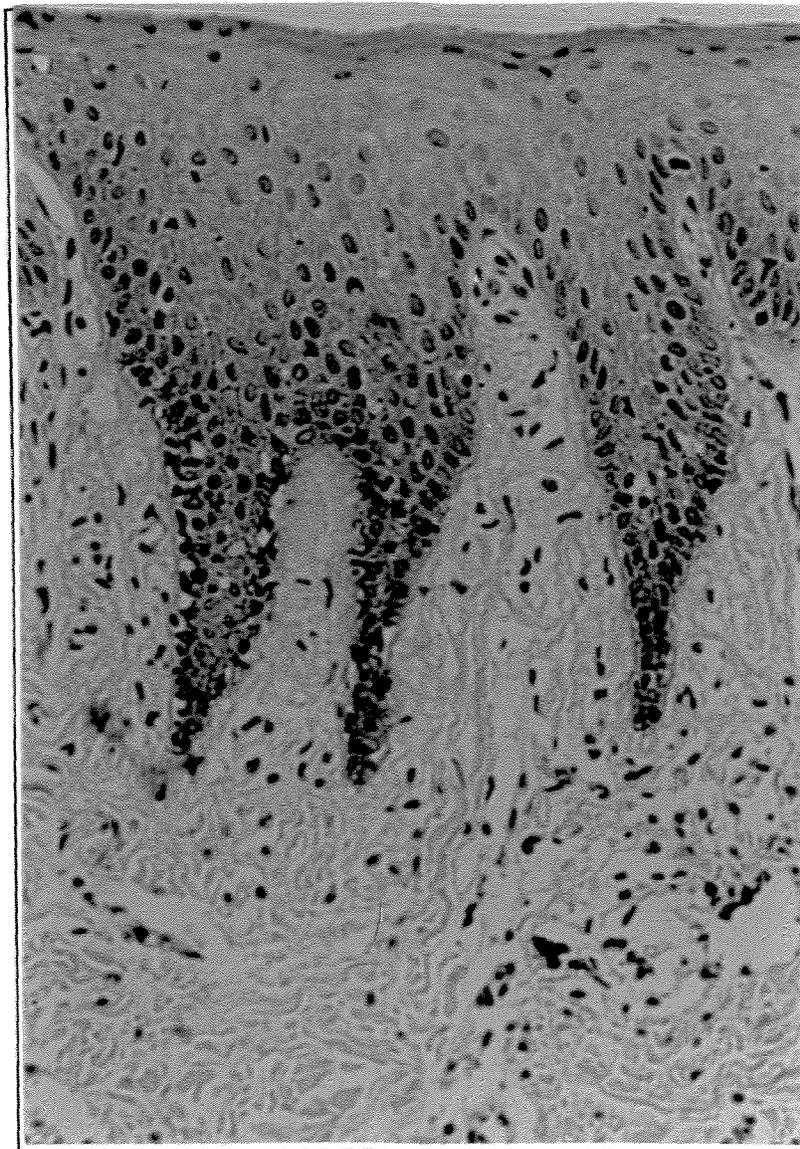


Fig. 5. Expressão do receptor de EGF em GN. Imunoreatividade para o receptor de EGF foi observada nas células das camadas basal, espinhosa e granulosa do tecido epitelial. O receptor de EGF foi distribuído pela membrana celular e citoplasma. (256x)

A tabela 5 descreve a positividade de marcação para o receptor de EGF nas camadas epiteliais dos grupos de GN e FGH. Em todas as camadas analisadas a positividade de marcação do receptor de EGF foi significativamente menor no grupo de FGH em relação ao grupo controle. A intensidade de reação para o receptor de EGF foi também significativamente menor no grupo de FGH (tabela 6). As células da camada basal foram as que apresentaram maior intensidade de reação, com uma diminuição gradativa na intensidade nas células da camada espinhosa e camada granulosa (tabela 6). No grupo controle, 9 (90%) amostras apresentaram uma graduação de intensidade de marcação igual a +++ para a camada basal, enquanto que para o grupo de FGH, apenas uma (10%) amostra apresentou esta graduação. A camada espinhosa também apresentou uma intensidade de reação maior no grupo controle, isto é, 90% das amostras do grupo controle apresentaram graduação +++ e nenhuma amostra apresentou esta graduação no grupo de FGH. Para a camada espinhosa, 30% das amostras do grupo de FGH receberam graduação ++ e 10% receberam graduação +. Na camada granulosa, todas as amostras de FGH foram negativas para a presença do receptor de EGF. O grupo controle apresentou 6 (60%) amostras positivas e 4 (40%) negativas.

Tabela 5. Positividade de marcação para o receptor de EGF e PCNA por camadas epiteliais nos grupos de GN e FGH.

	GN				FGH				P
	Positividade				Positividade				
	0	1	2	3	0	1	2	3	
Receptor EGF									
Camada basal	-	-	-	10	-	-	4	6	0,0005
Camada espinhosa	-	-	-	10	-	-	7	3	0,0001
Camada granulosa	4	6	-	-	10	-	-	-	0,005
PCNA									
Camada basal	-	-	-	10	-	-	2	8	0,14
Camada espinhosa	-	-	10	-	2	3	5	-	0,08
Camada granulosa	5	5	-	-	8	2	-	-	0,18

Tabela 6. Intensidade de reação para o receptor de EGF e PCNA por camadas epiteliais nos grupos de GN e FGH.

	GN				FGH				P
	Intensidade				Intensidade				
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
Receptor EGF									
Camada basal	-	-	1	9	-	1	8	1	0,0006
Camada espinhosa	-	-	1	9	-	7	3	-	0,0001
Camada granulosa	4	6	-	-	10	-	-	-	0,005
PCNA									
Camada basal	-	-	6	4	-	-	9	1	0,14
Camada espinhosa	-	4	6	-	-	8	2	-	0,08
Camada granulosa	5	5	-	-	8	2	-	-	0,18

Uma forte e positiva correlação entre positividade de marcação e intensidade de reação para o receptor de EGF foi observada em todas as camadas epiteliais analisadas (tabela 7). A camada basal apresentou 95% (n=19) das amostras com intensidade de reação graduada em ++ e +++, sendo que 80% (n=16) destas apresentaram positividade de marcação igual a 3. Na camada espinhosa, 65% (n=13) das amostras apresentaram um score ++ ou +++, sendo 65% (n=13) com positividade de marcação igual a 3. Setenta por cento (n=14) das amostras não mostraram expressão para a camada granulosa.

Todas as amostras que apresentaram marcação positiva na camada granulosa foram graduadas como positividade 1 e intensidade +.

Tabela 7. Correlação entre a positividade de marcação e intensidade de reação para o receptor de EGF para as camadas basal, espinhosa e granulosa.

Camadas Epiteliais	Coefficiente Phi	P
Camada basal	0,65	0,001
Camada espinhosa	0,80	0,001
Camada granulosa	1,00	0,0001

8.4. Expressão de PCNA:

A marcação para PCNA foi observada nas camadas basal, espinhosa e granulosa das amostras do grupo de GN e FGH (fig. 7-10). No tecido conjuntivo, a positividade de marcação foi evidenciada em fibroblastos de ambos os grupos. Embora não tenha ocorrido uma diferença estatisticamente significante, a positividade para PCNA e a intensidade de reação foi maior na camada basal com uma redução gradativa para as camadas espinhosa e granulosa, sendo negativa a reação para a camada córnea dos dois grupos analisados (tabela 5 e 6). Uma correlação significante entre o número de

células positivas e intensidade da reação foi observada nas camadas espinhosa e granulosa (tabela 8). Na camada espinhosa, 75% (n=15) das amostras apresentaram uma positividade com score de 2, sendo 40% (n=8) com intensidade ++ e 60% com intensidade +, enquanto que na camada granulosa 65% (n=13) das amostras foram negativas e o restante (35%, n=7) apresentaram positividade igual a 1 e intensidade +.

Tabela 8. Correlação entre a positividade de marcação e intensidade de reação para PCNA para as camadas basal, espinhosa e granulosa.

Camadas Epiteliais	Coefficiente Phi	P
Camada basal	0,19	0,4
Camada espinhosa	0,50	0,05
Camada granulosa	1,00	0,0001

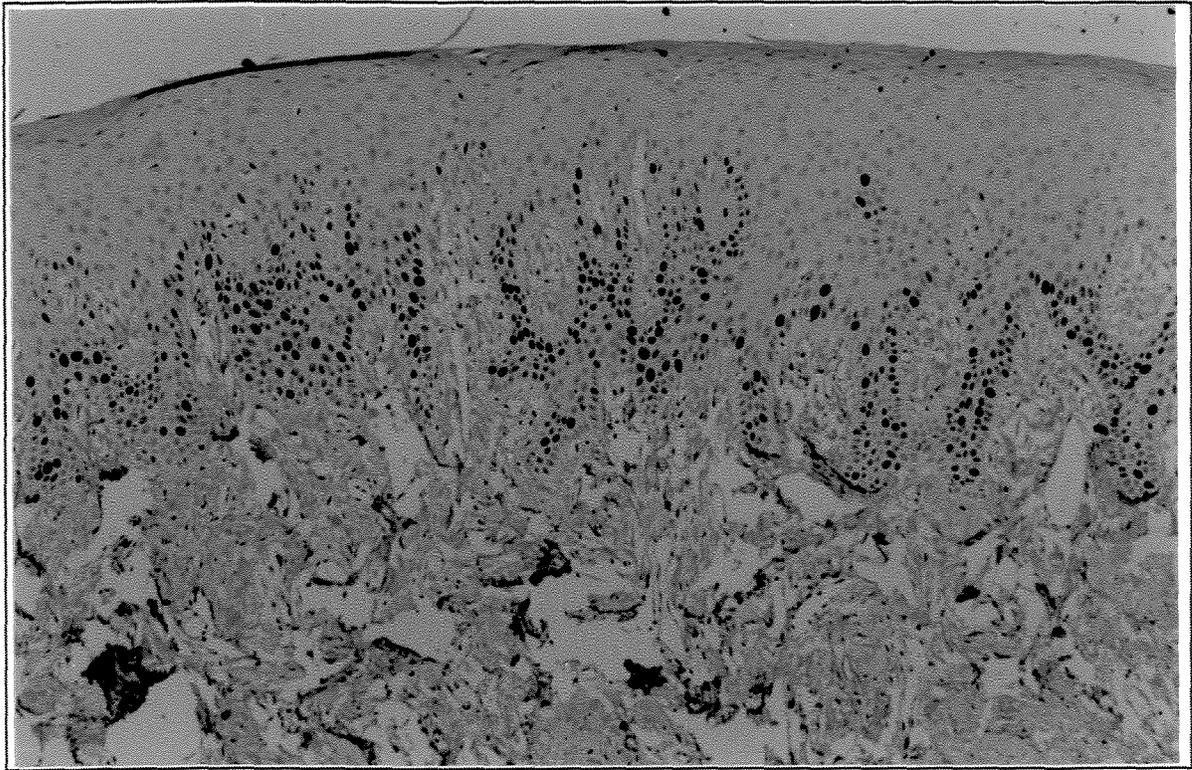


Fig. 7. Expressão imunohistoquímica para PCNA em uma amostra representativa do grupo de GN. Células com núcleo amarronzado foram consideradas positivas. Note a maior intensidade de reação nas células da camada basal. (100x)

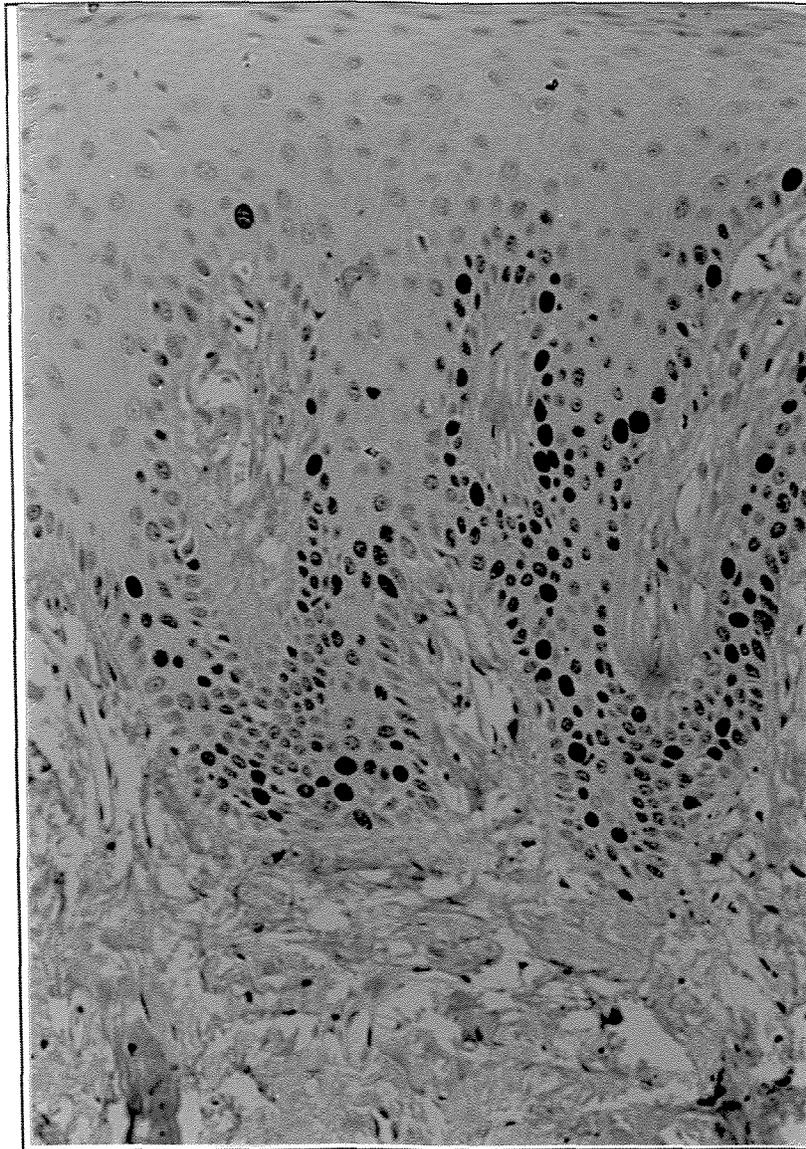


Fig. 8. Expressão imunohistoquímica de PCNA em uma das amostras do grupo de GN com maior detalhe do tecido epitelial. (200x)

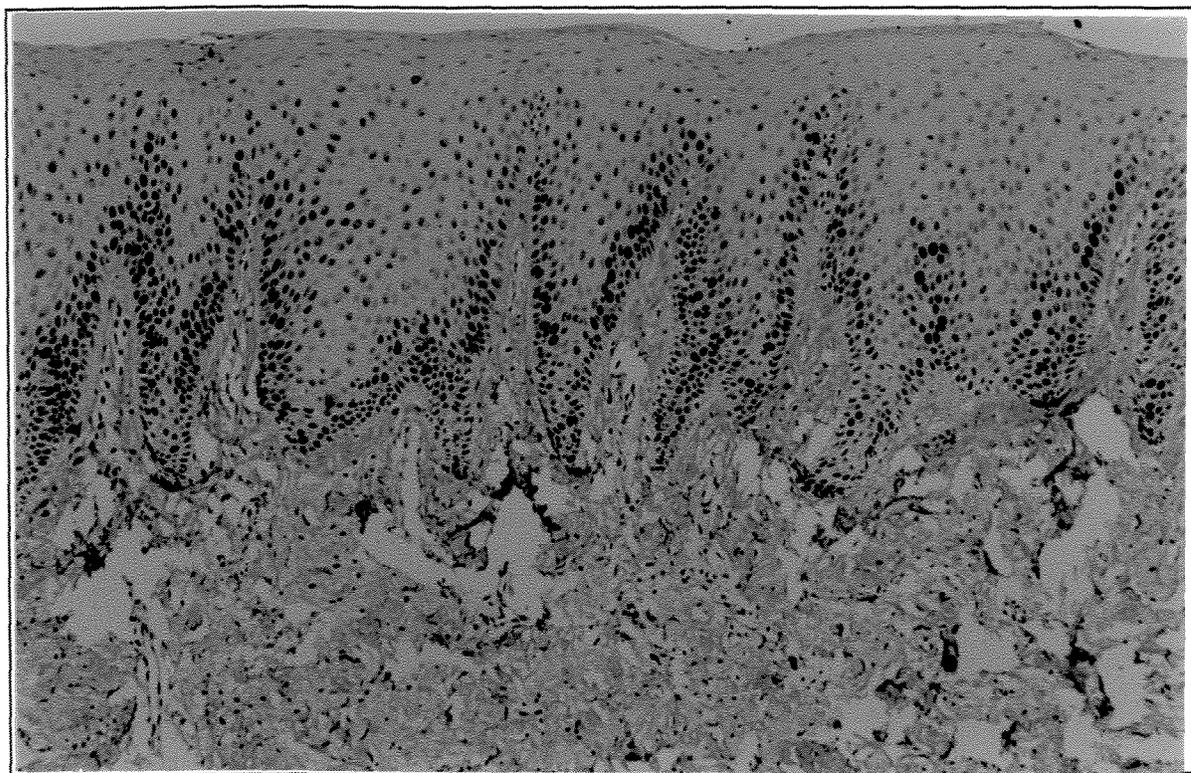


Fig. 9. Distribuição imunohistoquímica do PCNA em FGH. Células positivas para PCNA foram encontradas nos tecidos epitelial e conjuntivo. (100x)

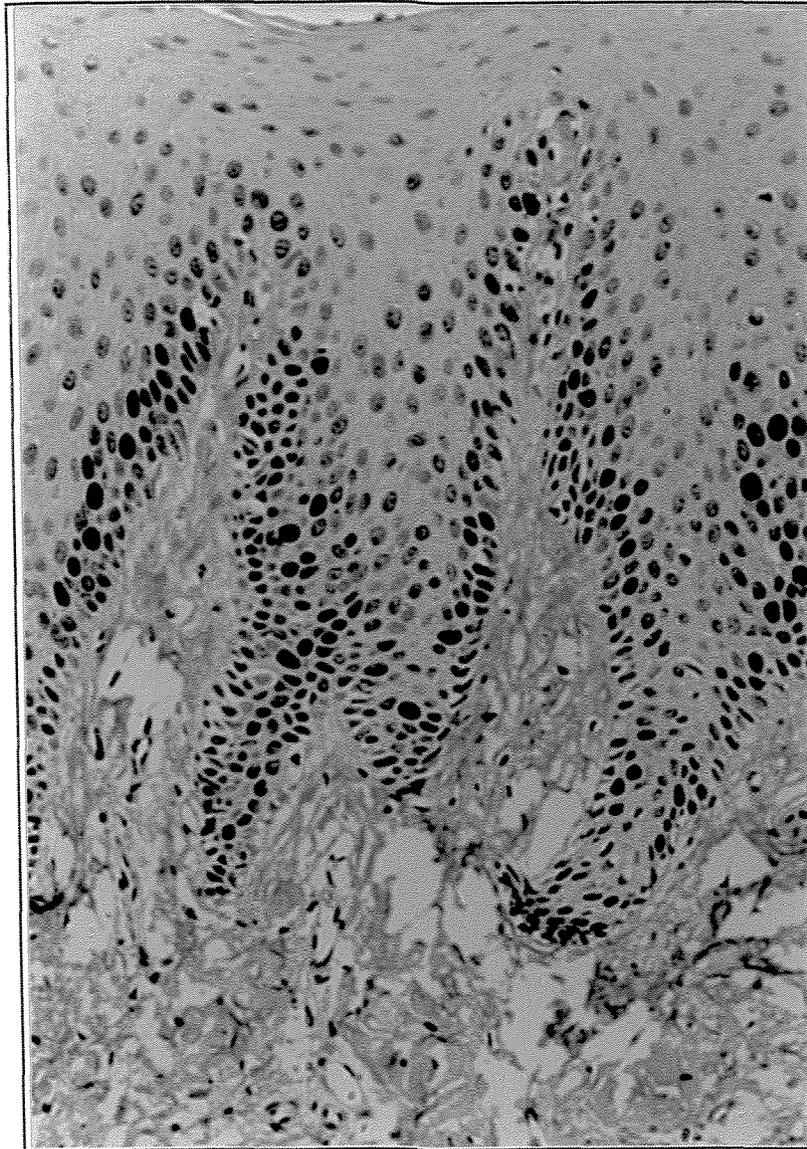


Fig. 10. Distribuição imunohistoquímica de PCNA em FGH com destaque para o tecido epitelial. Observe a positividade de marcação nuclear com graus variados de intensidade de reação. (200x)

8.5. Correlação da expressão imunohistoquímica entre o receptor de EGF e PCNA

A tabela 9 mostra a correlação da positividade de marcação e da intensidade de reação entre o receptor de EGF e PCNA nas camadas epiteliais. A grande maioria das amostras (80%) apresentaram para a camada basal uma positividade de marcação igual a 3 tanto para o anticorpo anti-receptor de EGF quanto para o anticorpo anti-PCNA, indicando uma forte associação linear entre as positivities destes dois anticorpos de aproximadamente 70% (coeficiente $\phi=0,66$, $p<0,01$). Na camada basal, 65% (n=13) das amostras foram negativas para marcação de PCNA e 70% (n=14) foram negativas para marcação com o receptor de EGF, demonstrando fortes indícios da existência de associação linear entre as positivities de marcação.

A camada granulosa foi a única que revelou a existência de uma associação entre as intensidades de reação para os dois anticorpos analisados. Sessenta por cento das amostras (n=12) foram negativas para a expressão de PCNA e para o receptor de EGF, indicando uma forte associação na ordem de aproximadamente 70% (coeficiente $\phi=0,66$, $p<0,01$). Não foram observadas nenhuma correlação significativa entre as medidas morfométricas e a

positividade ou intensidade de marcação para os anticorpos anti-receptor de EGF e anti-PCNA.

Tabela 9. Correlação entre a expressão imunohistoquímica do receptor de EGF e PCNA nas camadas basal, espinhosa e granulosa.

	Coefficiente Phi	P
Positividade		
Camada basal	0,66	0,005
Camada espinhosa	0,31	0,55
Camada granulosa	0,66	0,005
Intensidade		
Camada basal	0,16	0,52
Camada espinhosa	0,38	0,10
Camada granulosa	0,66	0,005

9. Discussão

O aumento gengival generalizado pode estar associado a várias causas como o uso de drogas incluindo ciclosporina, fenitoína e nifedipina (MARSHAL *et al.*, 1998), associado a condições inflamatórias e tumorais (REGEZI & SCIUBBA, 1999) ou ainda ser transmitido de forma hereditária, podendo ser componente de uma síndrome (GORLIN, 1990). No grupo estudado, o aumento gengival foi transmitido de forma autossômica dominante e nenhum dos indivíduos apresentou qualquer outra alteração comumente relacionada a FGH.

Está bem estabelecido na literatura que o aumento gengival observado em pacientes com FGH é resultado de uma hiperplasia não inflamatória dos elementos do tecido conjuntivo. Contudo, pouco se conhece a respeito das características do tecido epitelial que reveste este aumento gengival. A grande maioria das publicações sobre FGH descreve o epitélio como pavimentoso estratificado e queratinizado apresentando hiperplasia e profundas criptas epiteliais que se projetam em direção ao tecido conjuntivo subjacente, e que por vezes, podem se anastomosar (SINGER *et al.*, 1993; BROWN *et al.*, 1995; YALÇIN *et al.*, 1999). Para avaliar as características epiteliais do tecido

gengival de pacientes com FGH, amostras provenientes de membros de uma mesma família afetada por FGH (n=10) foram selecionadas e comparadas com amostras de tecido gengival normal em relação ao padrão histomorfométrico e expressão imunohistoquímica do receptor de EGF e PCNA.

A análise histológica das amostras demonstrou um padrão morfológico muito similar ao previamente descrito. O epitélio pavimentoso estratificado queratinizado apresentou profundas, delgadas e irregulares criptas epiteliais que se projetam em direção ao tecido conjuntivo, enquanto que o tecido conjuntivo apresentou-se denso com numerosos feixes de fibras colágenas permeados por fibroblastos e vasos sanguíneos. Nenhuma das amostras selecionadas para este estudo mostrou infiltrado inflamatório. Com o objetivo de comparar as características epiteliais das amostras de FGH com as amostras de GN, nós utilizamos a análise histomorfométrica. Histomorfometria é a mensuração linear de estruturas microscópicas (MANDARIN DE LACERDA, 1991). Este procedimento é relativamente simples e pode ser realizado com auxílio de programas específicos para informática, como nesta dissertação, ou de forma mais arcaica com a utilização de réguas milimetradas (FISHER & KLINGE, 1994; MANDARIN DE LACERDA, 1991).

A análise histomorfométrica demonstrou que a área epitelial por

centímetro linear de tecido gengival foi maior em FGH comparado a GN, contudo, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Entretanto, a profundidade das criptas epiteliais e o perímetro epitelial foram significativamente maiores nas amostras de FGH. A ausência de diferença na área epitelial entre as amostras de FGH e GN sugere que a profundidade das criptas epiteliais no tecido conjuntivo promova a diferença no perímetro epitelial entre os grupos de FGH e GN.

O tecido conjuntivo tem influência direta na arquitetura e na citodiferenciação epitelial. Estudos realizados através de recombinação epitelial mostraram que o tecido conjuntivo subepitelial pode modificar o fenótipo epitelial (HILL & MACKENZIE, 1984; MACKENZIE & HILL, 1984; BERNIMOULIN & SCHROEDER, 1980). SHARPE & FERGUSON (1988), estudando a influência do mesênquima na diferenciação epitelial em palato de ratos, obtiveram resultados que reforçam a afirmação acima, onde o tecido conjuntivo subjacente exerceu um importante papel na regulação e diferenciação epitelial. HOLMSTRUP *et al.* (1985) separaram e recombinaram os tecidos epitelial e conjuntivo da mucosa bucal humana. Estes autores demonstraram que a recombinação do tecido conjuntivo da região palato com epitélio da mucosa jugal induziu a citodiferenciação do

epitélio da mucosa jugal, que passou a apresentar uma arquitetura similar à do palato. Apoiado nestes estudos, nós podemos sugerir que as alterações no tecido conjuntivo gengival podem resultar na estimulação e na regulação da estrutura e proliferação das células epiteliais.

Outro fator que apoia a hipótese que o tecido conjuntivo pode influenciar os tecidos epiteliais está relacionado com a presença de resposta inflamatória (NASCIMENTO *et al.*, 1985; BOKOR-BRATIC *et al.*, 1998). Em nosso estudo, em uma amostra de FGH com intenso infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subjacente notou-se um aumento significativo na área e perímetro epitelial quando comparado com as amostras de GN (dado não apresentado). Este dado está de acordo com resultados encontrados em trabalhos analisando a influência da resposta inflamatória em aumentos gengivais por fenitoína (NASCIMENTO *et al.*, 1985). BOKOR-BRATIC *et al.* (1998) ao estudarem aumentos gengivais em pacientes que faziam uso crônico de nifedipina, observaram que as alterações gengivais ocorriam em locais onde fatores inflamatórios se faziam presentes. É importante salientar que um dos critérios utilizados para a seleção das amostras do nosso estudo foi a ausência de infiltrado inflamatório.

Embora este estudo seja o primeiro a descrever as características

epiteliais dos aumentos gengivais de pacientes com FGH, é interessante notar que análises similares foram realizadas para estudar as alterações epiteliais em aumentos gengivais induzidos por drogas (SAITO *et al.*, 1996, 1999 e 2000; SPOLIDÓRIO, 1996). SAITO *et al.* realizaram diversos estudos a fim de compreender melhor a patogênese dos aumentos gengivais induzidos por drogas como nifedipina e fenitoína através de técnicas de imunohistoquímica, analisando a expressão de TGF- β e fator de crescimento fibroblástico (FGF) (SAITO *et al.*, 1996), de marcadores de proliferação como a proteína p53 e Ki-67 (SAITO *et al.*, 1999) e ainda de produtos de proto-oncogenes como c-myc e bcl2 (SAITO *et al.*, 2000). Não foi observada nenhuma imunoreação significativa para TGF- β e FGF, entretanto foi observada expressão marcante aos demais anticorpos no epitélio que foram estudados por estes mesmos autores.

O EGF é um fator de crescimento com papel importante na indução do crescimento de células epiteliais e mesenquimais (COHEN, 1962; CARPENTER, 1987; SLAVKIN, 1988), incluindo células do epitélio oral (STEIDLER & READE, 1980). Contudo o efeito celular de EGF é dependente da expressão do receptor específico localizado na membrana da célula. Os dados na literatura em relação à expressão de EGF e de seu receptor são

controversos. IRWIN *et al.* (1991) não observaram nenhuma expressão imunohistoquímica do receptor de EGF em epitélio gengival normal. Posteriormente, WHITCOMB *et al.* (1993) e NORDLUND *et al.* (1991) demonstraram intensa imunomarcção para receptor de EGF nas células da camada basal de GN, com uma diminuição progressiva de marcação nas células das camadas espinhosa e granulosa. Nossos resultados de expressão imunohistoquímica do receptor de EGF foram similares aos publicados por WHITCOMB *et al.* (1993) e NORDLUND *et al.* (1991). A camada basal apresentou maior positividade de marcação e intensidade de reação que as células das outras camadas. Uma progressiva diminuição na positividade de marcação e intensidade de reação foi observada nas células das camadas espinhosa e granulosa. Estes achados são explicados provavelmente pela participação do receptor de EGF na proliferação epitelial, que ocorre em grande intensidade na camada basal. Embora tenha existido diferença, em todas as camadas, a positividade de marcação e intensidade de reação foram significativamente maiores no grupo de GN que no grupo de FGH, sugerindo um menor potencial proliferativo para as células de FGH.

Para comparar o potencial proliferativo das células epiteliais das amostras de GN e FGH, nós determinamos o índice imunohistoquímico de

expressão de PCNA. PCNA é uma proteína nuclear não histônica de 36 kDa componente da maquinaria de duplicação do DNA, estando também envolvida na regulação do crescimento celular (ALBERTS *et al.*, 1997; AKYOL *et al.*, 1998). Como uma proteína auxiliar da DNA polimerase delta, PCNA é absolutamente necessário para a duplicação do DNA *in vivo* e *in vitro* e, pelo menos, *in vitro* é também necessário no processo de reparo do DNA (ALVES *et al.*, 1999). A síntese de PCNA é diferencialmente expressa durante as fases do ciclo celular. Ao final da fase G1 do ciclo celular, a expressão de PCNA aumenta atingindo níveis máximos durante a fase S do ciclo celular, decaindo a partir da fase G2 e passando a apresentar novamente níveis basais na fase M e G1 (SHIPPER *et al.*, 1998). A detecção imunohistoquímica de PCNA é realizada apenas nas células que se encontram no final da fase G1 e nas fases S e G2 do ciclo celular (MACCORMICK, 1992; HUANG *et al.*, 1994; MARTINEZ-LARA *et al.*, 1996). Por estas características de identificar células nas fases de duplicação do DNA, o índice imunohistoquímico de expressão de PCNA tem sido amplamente utilizado como marcador de proliferação (OLIVEIRA *et al.*, 2000; MIGALDI *et al.*, 1998).

Nossos resultados de proliferação celular demonstraram uma positividade de marcação e intensidade de reação para PCNA similar entre os

grupos analisados. Embora não tenha ocorrido diferença entre os grupos, a positividade de marcação e intensidade de reação foram maiores nas células da camada basal, enquanto que as células das camadas granulosa e córnea foram praticamente negativas. Uma forte e positiva correlação foi observada entre as expressões do receptor de EGF e PCNA em todas as camadas celulares. A ausência de diferença no potencial proliferativo entre as amostras de GN e FGH, embora exista uma diferença na expressão do receptor de EGF, sugere que o controle da proliferação epitelial em FGH tem a participação de outros fatores, além de EGF.

A maior expressividade de PCNA e receptor EGF na camada basal encontrada neste trabalho sustentam o fato desta camada conter alto potencial proliferativo da mesma forma que os achados na camada granulosa confirmam a ausência de atividade mitogênica das células (CHO *et al.*, 1988; GREEN, 1983). Estudos realizados para detecção imunohistoquímica de PCNA em hiperplasias inflamatórias demonstraram que nestes tecidos houve uma intensa marcação das células epiteliais ao PCNA, indicando um aumento em seu potencial proliferativo (KAPLAN *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 1994).

Em resumo, os resultados por nós obtidos demonstraram claramente que não existem diferenças significativas entre os grupos de FGH e GN no que diz

respeito ao potencial proliferativo das células epiteliais. Associando os relatos da literatura aos resultados por nós obtidos, podemos sugerir que as alterações na arquitetura epitelial visualizadas nos tecidos de FGH não constituem uma hiperplasia epitelial, possivelmente por estas alterações não serem uma consequência da proliferação destas células.

10. Conclusões

- A.** O tecido epitelial em FGH apresenta o perímetro e a profundidade das criptas epiteliais significativamente maiores que o grupo controle. Embora a área epitelial seja maior em FGH em relação à GN, esta diferença não é estatisticamente significativa.
- B.** A positividade de marcação e intensidade de reação para o receptor de EGF foram significativamente maiores no grupo de GN.
- C.** Não foi observado diferença na expressão de PCNA entre os grupos de FGH e GN.

11. Referências Bibliográficas

Akyol M.U.; Dursun A.; Akyol G.; *et al.* (1998) Proliferating cell nuclear antigen immunoreactive and the presence of p53 mutation in basaloide squamous cell carcinoma of the larynx. *Oncology*, 55:382-383.

Alberts, B.; Bray D.; Lewis J.; *et al.* *Biologia Molecular da Célula* 3^aed. Artes Médicas, 1997.

Alves, V.A.F.; Bacchi C.E.; Vassalo J.; (1999) *Manual de Imunohistoquímica*. Sociedade Brasileira de Patologia, 270p.

Andrade C.R., *Análise do efeito autócrino do fator de crescimento transformante- β 1 na proliferação celular de fibroblastos gengivais de pacientes com fibromatose gengival hereditária*. Piracicaba, 2001 Tese (mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

Barros, S.P. *Fibromatose gengival hereditária aspectos morfológicos e ultraestruturais*. Piracicaba, 1991. Tese (mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

Bakaeen G.; Scully C. (1991) Hereditary gingival fibromatosis in a family with the Zimmermann-Laband syndrome. *J Oral Pathol Med*, 20: 457-59.

Becker W.; Zimmerman E.R.; Collings C.K.; *et al.* (1967) Hereditary gingival fibromatosis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol*, 24: 313-318.

Bennett N.T.; Schultz G.S. (1993) Growth factors and wound healing. *Am J. Surg*, v. 165, n. 6, p. 728-737.

Bernimoulin J.P.; Schroeder H.E. (1980) Changes in the differentiation pattern of oral mucosal epithelium following heterotypic connective tissue transplantation in man. *Pathol Res Pract*, 166:290-312.

Bokor-Bratic M.; Vuckovic N.; Selakovic S. (1998) gingival hyperplasia during treatment with nifedipine. *Med Pregl*, 51:445-448.

Bozzo L.; Almeida O.P.; Scully C. (1992) Familial gingival hyperplasia: a case of pseudo-Laband syndrome. *Periodont Clin Invest*, 14: 23-24.

Bozzo L.; Almeida O.P.; Scully C.; Adred M.J. (1994) Hereditary gingival fibromatosis: report of an extensive four-generation pedigree. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 78: 452-454.

Bozzo L.; Machado M.A.N.; Almeida O.P. (2000) Hereditary gingival fibromatosis: report of three cases. *J. Clin Pediatr Dent*, 25:41-46.

Brown R.S.; Trejo P.M.; Weltman R.; *et al.* (1995) Treatment of a patient with hereditary gingival fibromatosis: a case report. *Special Care in Dentistry*, 15: 149-153.

Carpenter G. (1987) Receptors for epidermal growth factor and other polipeptide mitogen. A. Rev. Biochem. 56, 881-914.

Carpenter G; Cohen S. (1979) Epidermal growth factor. Annu Rev Biochem, 48:193-216.

Carpenter G.; Cohen S. (1990) Epidermal growth factor. J. Biol Chem, 265: 7709-7712.

Castro A.L. (2000) Estomatologia, 3ªed, 235p.

Cho M.J.; Lee Y.L.; Garant P.R. (1988) Radioautographic demonstration of receptors for epidermal growth factor in various cells of the oral cavity. Anat Rec, 222:191-200.

Cohen S. (1962) Isolation of mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. J. Biol. Chem, 237:1555-1562.

Coletta R.D.; Almeida O.P.; Graner E.; *et al.* (1998) Differential proliferation of fibroblasts cultured from hereditary gingival fibromatosis and normal gingiva. J Periodont Res, 33:469-475.

Coletta R.D.; Almeida O.P.; Ferreira L.R.; *et al.* (1999a) Increase in expression of Hsp47 and collagen in hereditary gingival fibromatosis is modulated by

stress and terminal procollagen n-properties. *Connect Tissue Res*, 40(4): 237-249.

Coletta R.D.; Almeida O.P.; Reynolds M.A.; Sauk J.J. (2000) Alteration in expression of MMP-1 and TIMP-2 in hereditary gingival fibromatosis is mediated by TGF- β 1 autocrine stimulation. *J Periodont Res*, 34(8): 457-463.

Cuestas-Carnero R.; Bornancini C.A. (1988) Hereditary generalized gingival fibromatosis associated with hypertrichosis: report of five cases in one family. *J Oral Maxillofac Surg*, 46: 415-421.

Danesh-Meyer M.J.; Holborow D.W. (1993) Familial gingival fibromatosis: a report of two patients. *N Z Dent J*, 89:119-122.

Emerson T.G. (1965) Hereditary gingival hyperplasia: a family pedigree of four generations. *Oral Surg*, 19: 1-19.

Fletcher J.P. (1966) Gingival abnormalities of genetic origin: a preliminary communication with special reference to hereditary generalized gingival fibromatosis. *J Dent Res Supplement*, 3:597-612.

Fischer R.G.; Klinge B. (1994) Clinical and histological evaluation of ligature-induced periodontal breakdown in domestic ferrets immunosuppressed by Cyclosporin-A. *J Clin Periodontol*, 21:240-249.

Fox C.F.; Linsley P.S.; Wrann M. (1982) Receptor remodelling and regulation in the actions of epidermal growth factor. *Cell*, 41:2984:2994.

Goldblatt.J.; Singer S.L. (1992) Autosomal recessive gingival fibromatosis with distinctive facies. *Clin Genet*, 42:306-308.

Gorlin R.J.; Cohen M.M.J.; Levin L.S. (1990) Syndromes of the head and neck, 1ªed., 977p.

Green R.M.; Basketter A.; Couchman J.R.; Rees D.A. (1983) Distribution and number of epidermal growth factor receptors in skin is related to epithelial cell growth. *Developm Biol*, 100:506-512.

Gross (1856). Apud Takagi M.; Yamamoto H.; Mega H.; *et al.* (1991) Heterogeneity in the gingival fibromatosis. *Cancer*, 15: 2202-12.

Günhan O.; Gardner D.G.; Bostanci H.; Gunhan M. (1995) Familial gingival fibromatosis with unusual histologic findings. *J Periodontol*, 66:1008-1011.

Hamilton J.A; Lingelbach S.; Patridge N.C.; Martin T.J. (1984) Stimulation of plasminogen activator in osteoblast like cells by bone reabsorbing hormones. *Biochem. Biophys Res Commun*, 122: 230-236.

Hart T.C.; Pallos D.; Bowden D.W.;*et al.* (1998) Genetic linkage of hereditary gingival fibromatosis to chromosome 2p21. *Am J Hum Genet*, 62:876-883.

Hart T.C.; Pallos D.; Almeida O.P.; *et al.* (2000) Evidence of genetic heterogeneity for hereditary gingival fibromatosis. *J Dent Res*, 10: 1758-1764.

Hata R.; Sunada M.; Akai K.; *et al.* (1988) Regulation of collagen metabolism and cell growth by epidermal growth factor and ascorbate in cultured human skin fibroblasts. *Eur J Biochem*, 173:261-267.

Hill M.W.; Mackenzie I.C. (1984) The influence of differing connective tissue substrates on the maintenance of adult stratifical squamous epithelia. *Cell Tissue Res*, 237: 473-478.

Hine M.K. (1952) Fibrous hyperplasia of gingiva. *J Am Dent Res*, 44:681-691.

Homstrup P.; Dabelsteen E.; Harder F. (1985) EDTA separation and recombination of epithelium and connective tissue of human oral mucosa. *Expl Cell Biol*, 53: 32-40.

Huang W.Y.F.; Coltrera M.; Schubert M.; *et al.* (1994) Histopathologic evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PC10) in oral epithelial hyperplasias and premalignant lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 78: 748-754.

Irwin C.R.; Schor S.L.; Ferguson M.W.J. (1991) Expression of EGF-receptors on epithelial and stromal cells of normal and inflamed gingiva. J Periodont Res, 26:388-394.

Jonhson B.D.; El-Guindy.; Ammons W.F.; *et al.* (1986) A defect in fibroblasts from na unidentified syndrome with gingival hyperplasia as the predominant feature. J Periodont Res, 21: 403-413.

Kaplan I.; Vered M.; Moskona D.; *et al.* (1998) An immunohistochemical study of p53 e PCNA in inflammatory papillary hyperplasia of the palate: a dilemma of interpretation. Oral Dis, 4:194-199.

Kiristy C.P.; Lynch A.B.; Lynch S.E. (1993) Role of growth factors in cutaneous wound healing a reiew. Clin Ver Oral Biol Med, 4:729-760.

Konturek J.W.; Bielanski W.; Konturek S.J.; *et al.* (1989) Distribution and release of epidermal growth factor in man. Gut, 30:1194-1200.

Kurachi H.; Okamoto S.; Oka T. (1985) Evidence for involvement of the submandibular gland epidermal growth factor in mouse mammary tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci, 85:5940-5943.

Laskin D.L.; Laskin J.D.; Weistein I.B.; Carchman R.A. (1981) Induction of chemotaxis in mouse peritoneal macrophages by phorbolestes tumors promoters. Cancer Res, 41: 1923-1928.

Lev-Ran A.; Hwang D.L. (1990) Epidermal growth factor and platelet-derived growth factor in blood in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol*, 123:326-330.

Lyons J.G.; Birkedal-Hansen B. (1993) Interleukin-1 β and transforming growth- α / epidermal growth factor induce expression of Mr 95,000 type IV collagenase/gelatinase and interstitial fibroblast type collagen by rat mucosal keratinocytes. *J Biol Chem*, 268:19143-19151.

MacCormick D.; Hall P.A. (1992) The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology*, 21:591-594.

Mackenzie I.C.; Hill M.W. (1984) Connective tissue influences on patterns of epithelial architecture and keratinization in skin and oral mucosa of the adult mouse. *Cell Tissue Res*, 235: 551-559.

Malti R.A.; Chester J.F.; Gaisser H.A.; Ross J.S. (1987) Augmentation of chemically induced pancreatic and bronchial cancers by epidermal growth factor. *Gut*, 28:249-251.

Mandarin de Lacerda C.A. (1994) Manual de quantificação morfológica: morfometria, alometria, estereometria, 2^a ed. Rio de Janeiro: CEBIO.

Martelli-Júnior H.; Bolzani G.; Graner E.; Bozzo L.; Coletta R.D. (2000) Comparação microscópica e proliferativa de fibroblastos gengivais de

pacientes com gengiva normal e com fibromatose gengival hereditária. *Pesq Odont Bras*, 14:123-129.

Martinez-Lara I.; Gonzalez-Moles M.A.; Ruiz-Avila I.; *et al.* (1996) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a marker of dysplasia in oral mucosa. *Acta Stomatol Belg*, 93:29-32.

Marshall R.I.; Bartold P.M. (1998) Medication induced gingival overgrowth. *Oral Disease*, 4:130-151.

McIndoe A.; Smith B.O. (1958) Congenital familial fibromatosis of the gums with the teeth as a probable aetiological factor: report of an affected family. *Br J Plast Surg*, 11: 62-71.

Migaldi M.; Criscuolo M.; Zunarelli E.; *et al.* (1998) p120 and AgNO₂ nuclear proteins expression. A comparison with nuclear proliferation markers in oral pathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85:189-196.

Modeer T.; Yucel-Lindberg T.; Linuma M.; Lerner U.H.; Anderson G. (1993) Epidermal growth factor potentiates interleukin 1 and tumor necrosis factor-induced prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts. *Cytokines*, 5:198-204.

Nascimento A.; Barreto R.C.; Bozzo L.; Almeida O. P. (1985) Interaction of phenytoin and inflammation induces gingival overgrowth in rats. *Journal Periodont Res*, 20: 386-391.

Nevin N.C.; Scally B.G.; Kernohan D.C.; Dodge J.A. (1971) Hereditary gingival fibromatosis. *J Ment Defic Res*, 15:130-135.

Nordlund I.; Hormia M.; Saxen L.; Thesleff I. (1991) Immunohistochemical localization of epidermal growth factor receptors in human gingival epithelia. *J Peridont Res*, 26:333-338.

Oikarinen K.; Salo T.; Kaar M.L.; *et al.* (1990) Hereditary gingival fibromatosis associated with growth hormone deficiency. *Br J Oral Max Surg*, 28: 335-339.

Oliveira M.D.C.; Novellino A.T.; Freitas R.A. (2000) Expressão do PCNA em epitélio normal, hiperplásico e atípico de mucosa oral. *Rev Pos Grad*, 7:149-154.

Partanen A.M.; Thesleff I. (1987) Localization and quantification of I¹²⁵ epidermal growth factor binding in mouse embryonic tooth and other embryonic tissues at different developmental stages. *Dev Biol*, 120:186-197.

Pfeiffer P.; Clausen P.P.; Andersen K.; Rose C. (1996) Lack of prognostic significance of epidermal growth factor receptor and the oncoprotein p185^{HER-2} in patients with systemically untreated non-small-cell lung cancer: an immunohistochemical study on cryosections. *Br J Cancer*, 74:86-91.

Pietrzak A.; Miturski R.; Krasowska D.; *et al.* (1999) Concentration of an epidermal growth factor in blood serum of males during topical treatment of psoríases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 12(1):1-5.

Poulsen S.S.; Nexø E.; Olsen P. S.; Hess J.; Kirkegaard P. (1986) Immunohistochemical localisation of epidermal growth factor in rat and man. *Histochemistry*, 85:389-394.

Ramer M.; Marrone J.; Stahl B.; Burakoff R. (1996) Hereditary gingival fibromatosis: identification, treatment, control. *J Am Dent Ass*, 127:493-495.

Redman R.S.; Ward C.C; Patterson R.H. (1985) Focus of epithelial dysplasia arising in hereditary gingival fibromatosis. *J Periodontol* 56: 158-162.

Regezi J.A.; Sciubba J.J. *Oral Pathology: clinical pathologic correlations*. 3^a ed. Guanabara Koogan, 1999.

Rose S.P; Stahn R.; Passovoy D.S.; Herschamn H. (1976) Epidermal growth factor enhancement of skin tumor induction in mice. *Experientia*, 32:913-915.

Rushton M.A. (1957) Hereditary or idiopathic hyperplasia of the gum. *Dent Pract*, 7:136-146.

Ruggles S.D. (1925) Primary hypertrophy of the gums. *J Am Med Ass*, 84: 20-24.

Saito K.; Mori S.; Iwakura M.; *et al.* (1996) Immunohistochemical localization of transforming growth factor- β , basic fibroblast growth factor and heparan sulphate glycosaminoglycan in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. *J Periodont Res*, 31:545-555.

Saito K.; Mori S.; Tanda N.; *et al.* (1999) Expression of p53 protein and Ki-67 antigen in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. *J Periodontol*, 70(6):581-586.

Saito K.; Mori S.; Tanda N.; *et al.* (2000) Immunolocalization of c-Myc and bcl-2 proto-oncogene products in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. *J Periodontol*, 71:44-49.

Schour I.; Massler M. The teeth. In Farris E.I.; Griffith J.Q.J.R. (1971) *Rat in laboratory investigation*. 2^aed. Hafner Publishing, Cap. 6, p 105-135.

Sciubba J.J.; Niebloom T. (1986) Juvenile hyaline fibromatosis (Murray-Puretic-Drescher syndrome): Oral and systemic findings in siblings. *Oral Surg*, 62: 397-409.

Sharpe P.M.; Ferguson M.W. (1988) Mesenchymal influences on epithelial differentiation in developing systems. *J Cell Sci Suppl*, 10: 195-230.

Shipper D.L.; Wagenmans M.J.M.; Peters W. H. M.; *et al.* (1998) Significance of cell proliferation measurement in gastric cancer. *Eur J Câncer*, 34: 781-790.

Shirasuna K.; Okur M.; Watatani K.; *et al.* (1989) A sibling case of congenital gingival fibromatosis: treatment and post-operative evaluation. J Osaka Univ Dent Sch, 28: 1-8.

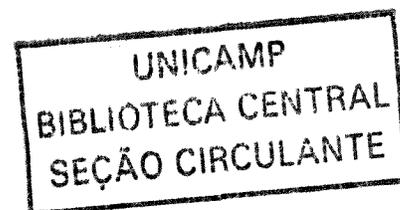
Shirasuna K.; Okur M.; Watatani K.; Hayashido Y.; Saka M.; Matsuya T. (1989) Abnormal cellular property of fibroblasts from congenital gingival fibromatosis. J Oral Pathol, 7:381-385.

Shroff B.; Kashner J.E.; Keyser D.; Hebert C.; Norris K. (1995) Epidermal growth factor and epidermal growth factor-receptor expression in the mouse dental follicle during tooth eruption. Arch Oral Biol, 41:613-617.

Singer S.L.; Goldblatt J.; Hallan L.A.; Winters J.C. (1993) Hereditary gingival fibromatosis with a recessive mode of inheritance. Case reports. Austr Dent J, 38:427-432.

Slavkin H.C. (1988) Molecular biology of dental development: a review. In The biological Mechanisms of Tooth Eruption and Root Resorption, pp. 107-116. EBSCO Media Birmingham, A.L.

Spolidório L.C. Aspectos morfométricos e esterométricos do aumento gengival induzido pela ciclosporina. Piracicaba – SP, 1996 (Tese de Doutorado). Faculdade de Odontologia de Piracicaba- Universidade Estadual de Campinas.



Steidler N.E.; Reade P.C. (1980) Histomorphological effects of epidermal growth factors on skin and oral mucosa in neonatal mice. *Archs. Oral Biol*, 25: 37-43.

Takagi M.; Yamamoto H.; Mega H.; *et al.* (1991) Heterogeneity in the gingival fibromatosis. *Cancer*, 15: 2202-2212.

Thompson M.W.; Mcinnes R.R.; Willard H.F. Thompson & Thompson *Genética Médica*, 1ªed., 339p., 1993.

Tommasi A.F. (1998) *Diagnóstico em Patologia Bucal*. 2ªed. 664p.

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

Tripton D.A.; Dabbous M.K. (1998) Autocrine transforming growth factor • stimulation of extracellular matrix production by fibroblasts from fibrotic human gingiva. *J Periodontol*, 69:609-619.

Turley E.A.; Hollenberg M.D.; Pratt R.M. (1985) Effect of epidermal growth factor/ urogastrone on glycosamino-glycan synthesis and accumulation in vitro in the developing mouse palate. *Differentiation*, 28: 279-285.

Xiao S.; Wang X.; Ou B.; *et al.* (2000) Refinement of the locus for autosomal dominant hereditary gingival fibromatosis (GINGF) to a 3.8-cM region on 2p21. *Genomics*, 68:247-252.

Wang S.L.; Lucier G.W.; Everson R.B.; Sunahara G.I.; Shieverick K.T. (1988) Smoking related alterations in epidermal growth factor and insulin receptors in human placenta. *Mol Pharmacol*, 34: 265-271.

Wells A. (1999) EGF receptor. *Int J of Biochem Cell Biol*, 31:637-643.

Whitcomb S.S.; Eversole L.R.; Lindermann R.A. (1993) Immunohistochemical mapping of epidermal growth factor receptors in normal human oral soft tissue. *Archs Oral Biol*, 38:823-826.

Wise G.E.; Lin F.; Fan W. (1992) Localization of EGF and its receptor in mandibular molar of the rat prior to and during prefunctional tooth eruption. *Dev Dyn*, 195:121-126.

Yalçın S.; Yalçın F.; Soyduñ M.; *et al.* (1999) Gingival fibromatosis combined with cherubism and psychomotor retardation: a rare syndrome. *J Periodontol*, 70: 201-204.

Yamamoto T.; Kamata N.; Kawano H.; *et al.* (1986) High incidence of amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human squamous carcinoma cell lines. *Cancer Res*, 46:414-416.