Raquel Fernanda Gerlach

ESTUDO DO PROMOTOR DO GENE DA CADEIA ALFA 2 DO COLÁGENO TIPO I EM PORTADORES DE FIBROMATOSE GENGIVAL HEREDITÁRIA

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, área de concentração Biologia e Patologia Buco-Dental.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, FOP-UNICAMP

Piracicaba

1997

Este exemplar foi devidamente corrigido conforme resolução CCPG 0/36-83

19/02/98

Raquel Fernanda Gerlach

ESTUDO DO PROMOTOR DO GENE DA CADEIA ALFA 2 DO COLÁGENO TIPO I EM PORTADORES DE FIBROMATOSE GENGIVAL HEREDITÁRIA

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, área de concentração Biologia e Patologia Buco-Dental.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, FOP-UNICAMP

Piracicaba

1997

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
Unicamp
G316e
V
EX 33852
TOMBO 395/98
PROC. D X
PREÇO R$ 11,00
DATA 15/05/98
N.º CPD
CM-00110266-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

G316e

Gerlach, Raquel Fernanda
Estudo do promotor do gene da cadeia alfa 2 do colágeno tipo I em portadores de fibromatose gengival hereditária / Raquel Fernanda Gerlach. – Piracicaba, SP : [s.n.], 1998.

Orientador: Sérgio Roberto Peres Line.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1.Gengivas. 2. Doenças hereditárias. 3. Genética. I. Line, Sérgio Roberto Peres. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

UNICAMP **FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Mestrado**, em sessão pública realizada em 17/02/98, considerou o candidato aprovado.

1.Sérgio Roberto Peres Line_____

2.Fausto Marchi_____

3.Lourenço Bozzo_____

À minha mãe,

cujo exemplo de coragem foi determinante
na minha formação como ser humano.

Ao José Eduardo,

que diariamente me mostra o quanto é difícil sonhar,
mas que vale a pena.

AGRADECIMENTOS

Em especial ao Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, pelo conhecimento, paciência e bom humor dos quais pude desfrutar sob sua orientação. Sem dúvida uma influência decisiva na minha vida.

Ao Prof. Dr. José Merzel, pela atenção às minhas dúvidas e pelo exemplo de seriedade em seu trabalho.

À Maria Ângela e ao Prof. Dr. Lourenço Bozzo, pelo caminho inicial que percorreram na peasquisa desta família de portadores de Fibromatose Gengival Hereditária.

À amiga Paula Cristina Trevilatto, pela amizade e atenção neste período de convivência.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, pela acolhida nas fases finais deste trabalho.

Aos colegas e amigos da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, onde se iniciou este trabalho, por quem tenho o maior apreço.

Aos colegas do Curso de Biologia e Patologia Buco-Dental, pelos momentos que compartilhamos.

À FAPESP, pela concessão do auxílio financeiro que viabilizou a execução deste trabalho (Processo 96/1769-9).

SUMÁRIO

Lista de Figuras	2
Resumo	3
Introdução	4
Revisão da Literatura	6
Materiais e Métodos	16
Resultados	21
Discussão dos Resultados	26
Conclusões	33
Summary	34
Referências Bibliográficas	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....p 9.

Figura 2.....p 12.

Figura 3.....p 13.

Figura 4.....p 22.

Figura 5.....p 23.

Figura 6.....p 24.

Figura 7.....p 25.

RESUMO

Há grande variação interindividual de fibroblastos gengivais em relação à síntese de proteínas da matriz. Esta variabilidade está bem documentada em casos de reação fibrótica gengival induzida por drogas, mas o mesmo não acontece em relação à Fibromatose Gengival Hereditária (FGH), condição em que há aumento da secreção de colágeno normal na matriz extracelular. Condições particulares individuais como polimorfismos genéticos ou mutações podem influir na resposta de fibroblastos a estímulos do ambiente.

Assim, procuramos identificar polimorfismos na região do promotor da cadeia alfa 2 do colágeno tipo 1 (COL1A2) em um grupo de pacientes normais (n=12) e outro de portadores de FGH (n=13). Além disso, também testamos a hipótese de alteração no padrão de metilação desta seqüência estar relacionada ao aumento da expressão do colágeno do tipo I em portadores de FGH.

Primeiramente foi feita a amplificação por PCR da região do promotor da cadeia alfa 2 do colágeno entre -340 e +2 pares de base(bp), porção do promotor que possui mais seqüências reconhecidas como determinantes na interação com fatores de transcrição. A este passo se seguiu a análise de heteroduplexes para a identificação de polimorfismos. Esta análise foi feita do seguinte modo: aquecimento das amostras a 98°C por 5 minutos, resfriamento a O°C e manutenção a 20°C por uma hora. A detecção de heteroduplexes foi feita em gel de poliacrilamida a 6%/ Tampão TBE, corado pelo método da prata. A análise de metilação foi feita através do uso de enzimas de restrição (HAL III e HPA II, que não clivam as suas seqüências de reconhecimento de DNA quando estas seqüências estiverem metiladas). Previamente à reação de PCR, o DNA foi digerido com as enzimas citadas. A metilação permitiria a amplificação da seqüência de DNA que estivesse metilada entre as regiões dos primers utilizados. Após a amplificação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%/ Tampão TBE, corado pelo método da prata.

Não houve diferença na migração dos fragmentos de DNA após a reação de heteroduplexes, nem foi detectada alteração no padrão de metilação entre os dois grupos de indivíduos. Estes achados indicam que mutações ou alteração no padrão de metilação da região do promotor do COL1A2 compreendida entre −340 e +2 bp provavelmente não estejam relacionadas ao crescimento gengival de portadores de FGH.

INTRODUÇÃO

A Fibromatose Gengival Hereditária (FGH) é uma proliferação difusa do tecido fibroso gengival, resultante de alterações genéticas de caráter autossômico dominante ou recessivo (TAKAGI *et al.*, 1991[67]). Clinicamente a FGH se apresenta como um crescimento lento e progressivo com aumento não inflamatório da gengiva da maxila e mandíbula, podendo este aumento interferir marcadamente com a fala, selamento labial, mastigação e aparência facial (SHIRASUNA *et al.*, 1988[63]). Histologicamente a FGH se caracteriza por um aumento da matriz extracelular, especialmente evidente pelo aumento do número de fibras colágenas. A etiologia desta anomalia permanece obscura.

Na Faculdade de Odontologia de Piracicaba tem sido estudada uma família afetada por FGH, que se manifesta como caráter autossômico dominante, possuindo uma expressividade variável, com penetrância provável de 100% (BOZZO *et al.*, 1994[10]).

Existem vários trabalhos experimentais mostrando grande variação interindividual de fibroblastos gengivais em relação a síntese de proteínas da matriz extracelular em resposta ao tratamento com drogas (TIPTON *et al.*, 1991[70]; MCKEVITT & IRWIN, 1995[47]). Condições particulares individuais como polimorfismos genéticos ou mutações poderiam influir na capacidade dos fibroblastos gengivais em responder a estímulos do ambiente.

O colágeno do tipo I, o colágeno mais abundante nas espécies de mamíferos, é constituído por três longas cadeias polipeptídicas, chamadas α(alfa)-hélices, na proporção 2 α1/ 1 α2. Estas cadeias são codificadas por genes diferentes (α1 pelo COL1A1 e α2 pelo COL1A2) e expressas de forma regulada e coordenada nos diferentes tecidos (RAMIREZ & DI LIBERTO, 1990[58]). Em algumas doenças fibróticas como escleroderma e cirrose hepática foi demonstrado o acúmulo de colágeno do tipo I (VARGA & JIMENEZ, 1995[74]), o qual poderia resultar da expressão aumentada dos genes COL1A1 e/ou COL1A2

(TAMAKI *et al.*, 1995). Sabe-se que a transcrição do gene COL1A2 pode ser regulada por seqüências de sua região 5′, ou seja, seqüências pelas quais vários fatores de transcrição têm afinidade (TAMAKI *et al.*, 1995[68]; INAGAKI *et al.*, 1995[28]). Deste modo, é possível que polimorfismos nesta seqüência estejam relacionados com desordens fibróticas pela alteração da interação com fatores de transcrição.

Além de terem sido sugeridos polimorfismos genéticos na seqüência imediatamente anterior ao início da transcrição (seqüência 5′, ou promotor), pensou-se também na metilação desta importante seqüência reguladora como causa para condições fibróticas. Estudos *in vitro* mostraram que a metilação do promotor do COL1A2 pode inibir parcialmente a transcrição deste gene (GUENETTE *et al.*, 1992[24]). Deste modo, uma "des"metilação incomum desta seqüência reguladora também poderia ter um papel no aumento da expressão deste gene.

Assim sendo, o objetivo do presente estudo é detectar polimorfismos nas sequências de DNA assim como variações no padrão de metilação na região promotora do gene COL1A2 em tecido gengival de portadores de fibromatose gengival hereditária.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Fibromatose gengival hereditária (FGH)

A FGH é uma doença bucal rara, caracterizada por crescimento lento e progressivo com aumento não inflamatório da gengiva da maxila e mandíbula. O aumento tecidual envolve completamente a gengiva e interfere marcadamente com a fala, selamento labial, mastigação e aparência facial (SHIRASUNA *et al*, 1988[63]).

Na grande maioria das famílias, demonstra ser herdada como característica autossômica dominante (JORGESON & COCKER, 1974[32]; BOZZO *et al*, 1994[10]) e, em poucas, como herança autossômica recessiva (JORGESON & COCKER, 1974[32]; SINGER *et al.*, 1993[65]).

A fibromatose gengival também pode ocorrer associada a outras anormalidades como hipertricose, epilepsia, esplenomegalia, oligofrenia e alterações esqueléticas (LABAND *et al.*, 1964[39]; JORGESON & COCKER, 1974[32]). Este aumento de volume tecidual tem sido associado a algumas síndromes, sendo que KILPINEN *et al.*[37], em 1978, descreveram uma família na qual 4 dos 8 filhos expressavam vários graus de fibromatose associada a retardo da erupção dos dentes permanentes e do crescimento esquelético. A FGH também foi relatada em associação com deficiência do hormônio do crescimento (OIKARINEN *et al.*[53], 1990). Além disso, houve relato de crescimento gengival em associação com ausência de características sexuais secundárias em algumas mulheres de uma família, mas estudos endocrinológicos sugeriram que neste caso, a associação entre o crescimento esquelético retardado e a fibromatose gengival era apenas coincidência (COLLAN *et al.*[16], 1982). Em 1995, WYNNE *et al.*[78] descreveram uma nova síndrome com padrão de herança autossômica dominante, em que a FGH ocorre associada a perda de audição, presença de dentes supranumerários e hipertelorismo.

A etiologia da FGH é obscura. Embora os relatos de casos clínicos e do pedigree de famílias acometidas não sejam tão raros nas revistas especializadas, poucos dados se têm sobre os aspectos histológicos e bioquímicos do aumento gengival. COLLAN *et al.* (1982) observaram a presença de dois tipos de fibroblastos no tecido afetado, um tipo mais arredondado, cercado por substância fundamental com pouco colágeno, e outro tipo de fibroblasto aparentemente inativo e cercado por áreas ricas em colágeno. Já JOHNSON *et al.* (1986) descrevem que a cultura de células do tecido gengival afetado de pacientes com FGH se caracteriza por produzir a metade do colágeno produzido por células normais, o que revela os resultados conflitantes dos poucos estudos sobre esta condição. SHIRASUNA *et al.* (1989), caracterizaram o tecido gengival afetado histologicamente como um tecido conjuntivo denso, rico em fibras colágenas, porém com poucos fibroblastos. O revestimento epitelial usualmente é normal, mas ocasionalmente podem ocorrer áreas hiperplásicas. Os achados relatados em estudos feitos por BARROS[3], em 1991, SALLUM[60], em 1993 e MACHADO[44],em 1996, com membros de uma mesma família afetada, também relatam este aspecto morfológico nos tecidos gengivais analisados.

Associando estes dados histológicos e de cultura de células aos dados de Fibromatose Gengival induzida por drogas, condição que têm como característica intrigante o fato de apenas surgir em cerca de um terço dos pacientes tratados com as drogas (PINDBORG, 1992[55]), surge a hipótese de diferentes indivíduos responderem diferentemente não somente a drogas, mas também a estímulos do meio ambiente. SHIRASUNA *et al.*[63], em 1988, sugeriram que a condição esteja relacionada a uma população de fibroblastos com tendência a sofrer alterações que a torne muito ativa na produção de substâncias da matriz extracelular, especialmente colágeno.

2. Colágeno

Os colágenos fazem parte de uma família heterogênea de proteínas fibrosas encontradas de todos os organismos multicelulares. São as proteínas mais abundantes em mamíferos, constituindo 25% da massa protéica total destes animais.

Já foram descritos mais de vinte tipos de colágenos quimicamente, geneticamente e imunologicamente distintos (VAN DER REST & GARRONE, 1991[72]). As moléculas dos diferentes tipos de colágeno são combinações de 25 diferentes tipos de cadeias α, cada qual codificada por um gene diferente. De modo geral, os colágenos podem ser classificados como fibrilares e não fibrilares. No primeiro grupo encontramos os colágenos dos tipos I, II, III, V e XI. Este grupo é o mais característico, pois têm as suas cadeias α organizadas na forma de fibrila, bem conhecida a partir do colágeno tipo I, o mais abundante. O colágeno tipo I é encontrado predominantemente na pele, ossos, mucosas, tendões, dentina, cápsula de órgãos, pericôndrio e cartilagem fibrosa (BARTOLD *et al.*, 1996[4]). Este tipo de colágeno é produzido por fibroblastos, osteoblastos, odontoblastos e condroblastos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995[33]).

A molécula do colágeno tipo I é um heterotrímero formado por duas cadeias α1 e uma cadeia α 2, organizadas num arranjo helicoidal. As cadeias α do colágeno tipo I possuem uma composição química peculiar, sendo extremamente ricas em glicina, amino-ácido encontrado na proporção de 30% do total de amino-ácidos da molécula. Além da glicina, as cadeias α contêm ainda os aminoácidos hidroxiprolina e hidroxilisina, que são raramente encontrados em outras proteínas (ALBERTS *et al.*, 1994[2]; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995[33]). Esta composição é freqüentemente caracterizada pela repetição da fórmula trimérica Pro-X-Gly, sendo a presença da prolina e da glicina fundamentais para a estabilização da α-hélice. As cadeias alfa do colágeno I são secretadas para a matriz extracelular como moléculas de pró-colágeno, contendo propeptídeos amino e carboxi terminais que são removidos por endopeptidases específicas. Após a remoção destas

porções da molélula, ocorre a polimerização de várias moléculas, com a formação de fibrilas de colágeno do tipo I, que possuem diâmetro médio de 78 nm (MONTES & JUNQUEIRA, 1982[48]) e muitos micrômetros de comprimento. As fibrilas freqüentemente estão dispostas paralelamente formando as fibras colágenas, com vários micrômetros de diâmetro e visíveis ao microscópio de luz.

O gene da cadeia α 1(I), cujo símbolo é COL1A1, está localizado na região 17q21.3-q22, e se constitui de 51 exons distribuídos por 18 kb, e o gene da cadeia α 2(I) (COL1A2) localiza-se na região 7q21.3-q22 e possui 52 exons, com tamanho total de 35 kb (CHU *et al.*, 1984[12]; RAMIREZ *et al.*, 1985[57]; VUORIO & DE CROMBRUGGHE, 1990[75])(Figura 1).

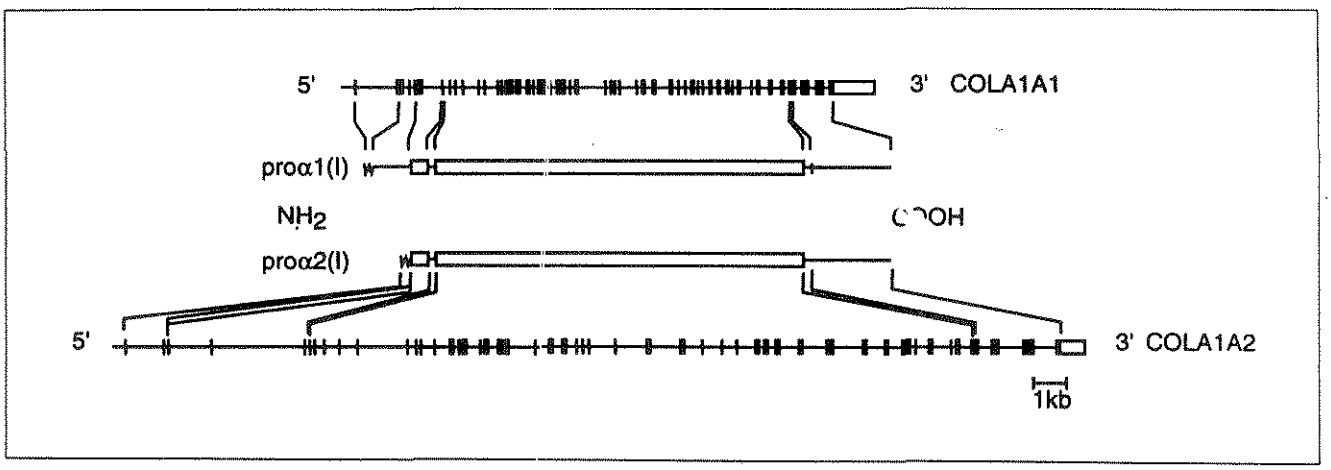

Figura 1. Esquema simplificado da estrutura dos genes das cadeias alfa 1 (COL1A1) e alfa 2 (COL1A2) do colágeno tipo I, mostrando a organização íntrons/éxons. Os éxons são simbolizados pelas barras verticais (BARTOLD *et al.*, 1996[4]).

A síntese de duas cadeias α1 e α2 na proporção 2:1 é bem regulada, mas ainda pouco esclarecida (KARSENTY & DE CROMBRUGGHE, 1991[34]). Por exemplo, quando se causa uma alteração no primeiro íntron do gene COL1A1 em células da linhagem germinativa de camundongo através da integração do gene viral MoMLV, há inativação da transcrição do gene COL1A1 e, conseqüentemente, não há mais síntese de colágeno. Os embriões morrem entre 12 e 14 dias. Quando são analisados os germes dentais destes embriões, percebe-se que houve síntese normal de colágeno do tipo I, indicando que a regulação da transcrição em odontoblastos não acontece no íntron I, como nos fibroblastos (KRATOCHWIL *et al.*, 1989[38]).

O controle na quantidade de colágeno em um tecido também depende de eventos posteriores à transcrição do gene e início da síntese das cadeias polipeptídicas. Neste sentido, é um fenômeno bem caracterizado a degradação intracelular de cadeias ou moléculas anormais, assim como o papel relevante da fagocitose de fibras colágenas por fibroblastos em situações de remodelação tecidual (EVERTS *et al.*, 1989[20]; VAN DER ZEE *et al.*, 1996[73]). Especialmente em processos fisiológicos de desenvolvimento ou processos patológicos, torna-se importante o papel das metaloproteinases e outras proteinases da matriz para a degradação do colágeno (BIRKEDAL-HANSEN, 1993[5]). Como a matriz está em constante processo de remodelação, é um conceito comum de capítulos sobre colágeno aquele que afirma que a quantidade de fibras em um determinado momento é resultado do equilíbrio dinâmico entre síntese e degradação (ALBERTS *et al.*, 1994[2]). Embora este conceito pareça muito simples, a maioria dos processos patológicos fibróticos continua insuficientemente compreendida. É o caso da fibrose pulmonar ou da cirrose hepática, ambos caracterizados, entre outros aspectos, pelo acúmulo de colágeno tipo I. Já nos processos fisiológicos de remodelação tecidual, como no caso do reparo, em que ocorrem profundas alterações na matriz, falta muito para se compreender como um

equilíbrio tão delicado é mantido na síntese de colágeno (COTRAN *et al.*, 1994[17]).

As várias anomalias genéticas que estão relacionadas com alterações no gene do colágeno I refletem bem a importância desta proteína (VUORIO & DE CROMBRUGGHE, 1990[75]). Uma das mais dramáticas e a mais bem conhecida é a Osteogênese Imperfecta (SYKES, 1990[66]), resultante principalmente de mutações na estrutura de uma das α-hélices do colágeno do tipo I.

Nas doenças fibróticas, como dito acima, sugeriu-se a desregulação da síntese das cadeias do colágeno tipo I (quando há acúmulo de colágeno tipo I normal na matriz) como possível causa para o processo, mas muito pouco ainda se sabe a respeito (TAMAKI, 1995[68]). Parece que tentativas recentes de caracterizar a porção reguladora da trancrição das cadeias alfa, assim como o acúmulo de informações sobre o papel das diversas citocinas a nível celular irão em breve apontar para a solução deste mistério.

3. Regulação da síntese protéica

Há vários estágios na síntese protéica desde o DNA até a proteína perfeitamente sintetizada. A célula eucariótica pode controlar a sua síntese proteíca em qualquer um ou, como ocorre usuamente, em vários dos estágios. A expressão do gene é o evento que mais se relaciona com a síntese de uma proteína, e justamente aquele que possui vários níveis de controle. São eles: 1) controle transcricional, 2) controle de processamento do RNA, 3) controle do transporte do RNA, 4) controle da tradução (selecionando o RNA que será traduzido), 5) controle de degradação do mRNA, 6) controle da atividade protéica (ativando, desativando ou compartimentalizando seletivamente moléculas protéicas depois de sintetizadas) (ALBERTS e cols, 1994). Para a maioria dos organismos eucariontes, o controle transcricional é fundamental. Isso é facilmente explicável pelo fato desta forma de controle não gerar metabólitos intermediários supérfluos cuja síntese é dispendiosa para a célula (Fig. 2).

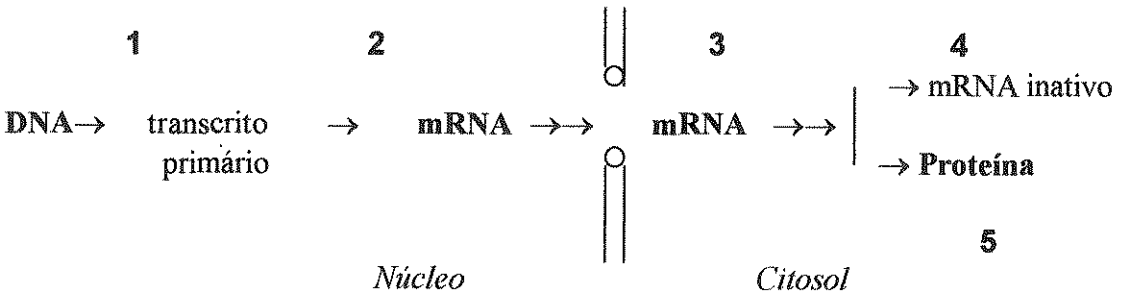

Figura 2. Esquema dos principais passos nos quais a expressão de um gene pode ser controlada. O controle transcricional é o passo evolutivamente mais favorável e o mais comum em eucariontes. Controles: (1) transcricional, (2) processamento do transcrito primário, (3) transporte do RNA, (4) tradução, (5)atividade da proteína. (Adaptado de ALBERTS *et al.*, 1994[1])

Para discutir o controle transcricional, é importante inicialmente esclarecer de forma resumida o processo de transcrição de um gene eucariótico, bem como os principais conceitos envolvidos neste processo.

Um gene é definido como uma seqüência de DNA necessária para a decodificação de um produto funcional, seja este um RNA ou um proteína (ALBERTS *et al.*, 1994[1]). Um trecho muito importante da seqüência de um gene é o promotor, que em geral está situado "antes" do início da parte do gene que será transcrito. O promotor é a seqüência de DNA que permite a ligação da RNA-polimerase, enzima que irá fazer a transcrição, ou seja, a síntese de RNA a partir da "leitura" do DNA. Certas proteínas com afinidade por seqüências de DNA determinam a trancrição dos genes, sendo chamadas de fatores de transcrição. Os fatores de transcrição são também denominados fatores "trans" (trans-acting-factors). Já as seqüências de DNA necessárias à ligação dos fatores de transcrição são chamadas fatores "cis" (cis-acting-factors)(LEWIN, 1994[42]).

Um aspecto muito importante do ponto de vista evolutivo foi a sofisticação do processo de transcrição. Quanto mais bem regulada a transcrição do gene para RNA, menos energia a célula (e o organismo como um todo) necessita para cada processo metabólico. Como conseqüência, nos organismos mais evoluídos, encontram-se grandes quantidades de

fatores que regulam a transcrição agindo na região do promotor. Desta forma, o delicado equilíbrio da síntese protéica é regulado por processos complexos em que citocinas e hormônios tomam parte interagindo com fatores de transcrição (ALBERTS *et al.*, 1994[1]).

4. Regulação da síntese de colágeno tipo I

Embora mecanismos pós-transcrição possam estar envolvidos na regulação da síntese do colágeno, há evidências que indicam que o controle transcricional representa a forma de regulação mais importante (BORNSTEIN, 1996[9]). A este nível, a expressão dos genes do colágeno I pode ser regulada por vários fatores exógenos como ácido ascórbico (VUUST *et al.*, 1985[76]), glicocorticóides (HÄMÄLÄINEN *et al.*, 1985[25]; COCKAYNE *et al.*, 1986[15]) ou citocinas (GOLDRING *et al.*, 1986[22]). Neste último grupo se encontram citocinas como TGF-β, TNF-α e IL-1, cuja interação com fatores de transcrição a nível de promotores das cadeias de colágeno começam a ficar mais bem esclarecidos, o que torna estas substâncias o grupo de substâncias mais promissor para a compreensão da regulação da transcrição do colágeno tipo I.

Mediadores que afetam a síntese de colágeno	
Mediador	Efeito
TGF-β	↑
PDGF	↑
INF-γ	↓
IL-1α,β	↑
TNF-α	↓
PGE_2	↓
Glicocorticóides	↓
Vitamina D	↓

Figura 3. Tabela ilustrativa quanto aos efeitos de diferentes mediadores sobre a síntese de colágeno (adaptado de BARTOLD *et al.*, 1996[4]). TGF-β = Transforming Growth Factor β; PDGF = Platelet Derived Growth Factor; INF-γ = Interferon γ; IL-1 = Interleukin 1; TNF-α = Tumor Necrosis Factor α; PGE_2 = Prostaglandin E_2.

A transcrição dos genes COL1A1 e COL1A2 é regulada por promotores localizados nas regiões que flanqueiam a porção 5' dos genes assim como por região "enhancer" localizada no primeiro íntron (CHU et al., 1985[13]; ROSSOUW et al.,1987[59]; BORNSTEIN *et al.*, 1987[7]; BORNSTEIN *et al.*, 1988[8]; BOAST *et al.*, 1990[6]). A análise juncional do promotor do COL1A1 mostrou que a maior parte da atividade está localizada entre -1 e -174 pares de bases (pb) do local de início de transcrição e que elementos reguladores negativos estão localizados entre -800 e -5000 pb do início da transcrição (JIMENEZ *et al.*, 1994[30]). Entretanto, a maior parte dos estudos revela que há um grande número de sítios de ligação de proteínas no promotor do COL1A2 principalmente entre -330 e -230 pb, os quais aparentemente são os principais responsáveis pela regulação do COL1A2 (INAGAKI *et al.*, 1994[27]; TAMAKI *et al.*, 1995[68]).

Vários autores estudaram padrão de metilação nas regiões reguladoras de transcrição dos genes COL1A1 e COL1A2. O genoma de eucariontes contém 5-metilcitosina, que ocorre como modificação covalente pós-duplicação da citosina. A metilação ocorre preferencialmente em seqüências CpG e tem sido correlacionada com a taxa de transcrição do gene. Existem inúmeros trabalhos mostrando correlação inversa entre o grau de metilação das regiões reguladoras e a taxa de transcrição de genes (CEDAR *et al.*, 1988[11]). Estudos em galinha mostraram que a região promotora do COL1A2 não é metilada, independentemente das células expressarem ou não o gene (MCKEON *et al.*, 1982[46]; FERNANDEZ *et al.*, 1985[21]). Entretanto, foi demonstrado que a metilação *in vitro* de plasmídios contendo promotores do gene COL1A1 e COL1A2 inibe a atividade transcripcional dos genes em linhagens celulares (THOMPSON *et al.*, 1991[69]; GUENETTE *et al.*, 1992[24]). Além disso, foi verificado que o tratamento com 5-azacitidina, que é um potente inibidor da metilação, é capaz de ativar a transcrição do gene COL1A1 em linhagem celular de rabdomiossarcoma humano (THOMPSON *et al.*, 1991[69]). Estas

evidências sugerem que a metilação do DNA possa estar envolvida na regulação da transcrição dos genes do colágeno do tipo I.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração de DNA a partir de biópsias gengivais

O DNA genômico foi obtido a partir de biópsias gengivais de 13 indivíduos portadores de fibromatose gengival hereditária e 12 indivíduos normais.

A biópsia foi feita com o consentimento do paciente segundo os recomendações do código de ética para os projetos financiados pela FAPESP.

Para a obtenção do DNA genômico os fragmentos foram digeridos por 16 horas a 37^0C em tampão Tris (pH 8.0) a 10 mM, $CaCl_2$ a 1mM, SDS a 0,5%. Os fragmentos eram mantidos por uma hora neste tampão antes de se adicionar a Proteinase K (100 μg/mL). Após digestão, o material foi extraído com solventes orgânicos. A primeira extração foi feita em fenol, as duas extrações seguintes em mistura fenol/clorofórmio 1:1, e a última em clorofórmio. O DNA foi precipitado com 1/10 v/v de acetado de sódio 3 M, pH 5,2, e dois volumes de etanol absoluto; o pellet formado após o resfriamento e centrifugação (às vezes invisível) era lavado em álcool 70 e ressuspenso em Tris-Cl 10 mM e EDTA 0,5 mM (pH solução: 7,6). A quantificação e determinação do grau de pureza do DNA extraído foi feita pela leitura da solução em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

O fenol foi preparado aquecendo-se a quantidade desejada a 68°C e acrescentando-se hidroxiquinolina (0,1%). O pH foi equilibrado a 7,8 em extrações sucessivas comTris-Cl 0,1 M (pH 8,0). Depois que a última fase aquosa foi removida do fenol com o pH já ajustado, acrescentou-se 1/10 v/v de Tris-Cl 0,1 M (pH 8,0) contendo 0,2% β-mercaptoetanol. O clorofórmio foi preparado com 24 partes de clorofórmio para uma de álcool isoamílico. A mistura fenol/clorofórmio consiste em partes iguais de fenol equilibrado e clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1)(SAMBROOK *et al.*, 1994[62]).

Extração de DNA a partir de Bochechos

Conforme proposto no projeto original, extraiu-se DNA a partir de gengiva, que é um tecido de que se dispõe facilmente quando se faz acompanhamento de pacientes portadores de FGH (pois os mesmos necessitam de remoção de excesso de tecido fibrótico de tempos em tempos). Também se conseguiram fragmentos de gengiva normal de pacientes submetidos a exodontias ou a outros procedimentos que facilitariam a biópsia da gengiva. A proposição de análise do padrão de metilação, que é específica de cada tecido e local, era o que tornava imprescindível que se obtivesse o DNA a partir do tecido comprometido, a gengiva. Contudo, para a outra análise que foi proposta no projeto original (a análise de heteroduplex), precisa-se apenas da amplificação do gene (ou parte de gene) em que se quer pesquisar formas alélicas, não sendo de qualquer importância o tecido do qual provém o DNA.

Em dois trabalhos que pesquisavam a prevalência de papilomavírus em células de mucosa oral, encontrou-se um método simples para a obtenção de DNA sem incômodo para os indivíduos participantes (LAWTON *et al.*, 1992[40]; OSTWALD *et al.*, 1994[54]). O bochecho vigoroso de soluções isotônicas é uma maneira fácil de se obter células que descamam da mucosa bucal. Após o bochecho, a solução é centrifugada em velocidade que permita a precipitação da maior parte das células eucarióticas (LENCH *et al.*, 1988[41]). Procederam-se, então, as primeiras extrações de DNA a partir de células de mucosa de pacientes da clínica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, de quem se obteve o consentimento para o procedimento e informações quanto a sexo, idade e cor.

Pediu-se que os indivíduos bochechassem vigorosamente 10 ml de solução de glicose a 3% por 40 segundos. Fez-se ainda rápida raspagem da mucosa jugal com bastão de madeira, que era então mergulhado e agitado na solução bochechada. As soluções foram centrifugadas (decorrido apenas o tempo da coleta até chegar ao laboratório) por 10 minutos a 2.000 rpm (raio da centrífuga: 15 cm). O sobrenadante foi descartado e o pellet

foi ressuspenso em 1 ml do tampão modificado de LAWTON *et al.*[40], 1992. A esse tampão se acrescentou $CaCl_2$, retirou-se EDTA e se substituiu 400 U/ml de penicilina e 400 U/ml streptomicina por 600 U/ml garamicina (gentamicina), resultando então o seguinte tampão de extração: 10 mM Tris-Cl (pH 7,8), 1 mM $CaCl_2$, 0,5% SDS, 600 U/ml garamicina e proteinase K (50 ng/ml). As amostras foram encubadas a 37°C O.N. e o DNA purificado conforme o protocolo padronizado para a extração a partir de tecido gengival.

Desenho dos Oligonucleotídeos

A seqüência do promotor utilizada para desenho dos primer foi baseada nas publicações de INAGAKI *et al.*[28], 1995, e DICKSON *et al.*[19], 1992, conforme segue (os oligonucleotídeos foram sublinhados por uma única linha, e estão representados abaixo por 1 a 4):

$^{-340}$TCCGACGTGTCCCATAGTGTTTCCAAACTTGGAAGGGCGGGGGAGGGCGGGAGGATGC
GGAGGGCGGAGGTATGCAGACAACGAGTCAGAGTTTCCCCTTGAAAGCCTCAAAAGTGTCC
ACGTCCTCAAAAAGAATGGAACCAATTTAAGAAGCCAGCCCCGTGGCCACGTCCCTTCCC
CCATTCGGGCCCTCCTCTGCGCCCCCGCAGGCTCCTCCCCGCTGTGGCTGCCCGGGCCCC
CAGCCCCAAGCCCTCCCATTGGTGGAGGCCCTTTTGGAGGCACCCTAGGGCCCAGGGAAACT
TTTGCCGTATAAATAGGGCAGATCCGGGATTTGTTATTT^{+}T^{1}AGCACCACGGCAGCAGGAGGT
TTCGGCTAA^{+30}

1. $^{-340}$TCCGACGTGTCCCATAGTGTTTC^{-318}
2. $^{-141}$GCAGAGGAGGGCCCGAATGG^{-160}
3. $^{-183}$GCCCCGTGGCCACGTCCCTTC^{-163}
4. $^{+21}$ACCTCCTGCTGCCGTGGTGC^{+2}

1. PCR. Cerca de 300 ng de DNA genômico foram utilizados para cada reação de 50 µl. A mistura da reação continha ainda 200 nM de oligonucleotídeos (primers), 200 µM dNTPs e 0,5 unidades de Taq Polimerase (AmpliTaq, Perkin-Elmer). O tampão e os dNTPs eram parte de um kit para PCR (Perkin-Elmer). As amostras foram inicialmente desnaturadas a 94°C por 4 min e submetidas a 35 ciclos de 94°C por 1 min , 60°C por 1 min, 72°C por 2 min em um termociclador (Perkin-Elmer Cetus, CT). Tão logo terminadas as reações, as enzimas eram inativadas pela adição de EDTA a 10 mM. A amplificação para as análises de heteroduplex era feita utilizando-se dois conjuntos de primers (1+2 e 3+4), resultando destas reações dois fragmentos de 199 pb e 204 pb, respectivamente. A amplificação para as análises de metilação foi feita utilizando-se outra combinação de primers (1+4), resultando destas reações um fragmentos de 361 pb.

2. Análise de heteroduplex. Após o último ciclo de PCR as amostras foram aquecidas a 98°C por 5 minutos, encubadas em gelo por 1 minuto e deixados a 20°C por 60 minutos para formação de heteroduplexes. Os fragmentos foram separados em gel de poliacrilamida 6% em tampão TBE e corados pela prata.

3. Análise de metilação. O DNA genômico foi encubado com enzimas de restrição Hal III (GGCC) e Hpa II (CCGG), em reações distintas para cada uma destas enzimas, em tampão e temperatura recomendados pelo fabricante. As seqüências reconhecidas por estas enzimas são encontradas 7 vezes na região que analisada (entre os nucleotídios -340 e +21 do gene COL1A). Se pelo menos uma cópia do gene estiver metilada em todas as seqüências CpG, as endonucleases não serão capazes de clivar o DNA, e, deste modo, haverá uma seqüência intacta que poderá servir de "template" para a amplificação, tendo-se como resultado um fragmento de 361 pb. Depois da digestão pelas endonucleases, a mesma

quantidade de DNA utilizada nas reações de PCR descritas anteriormente foi utilizada, mantendo-se iguais as demais condições das reações. Foram feitas também reações controle, cujo DNA não havia sofrido digestão com enzimas de restrição. Após reação os produtos das reações foram analisados em gel de poliacrilamida a 6% em tampão TBE e corados pela prata.

RESULTADOS

O resultado das reações de heteroduplex podem ser vistos na figura 4. As amostras submetidas a condições de formação de heteroduplex foram submetidas a eletroforese ao lado de amostras controle (não submetidas às condições de formação de heteroduplex). As bandas evidentes no gel revelam que não houve formação de heteroduplex, pois não houve alteração na velocidade de migração do fragmento de 200 pb amplificado. O heteroduplex migraria apenas um pouco mais lentamente do que as bandas de 200 pb que aparecem no gel. As bandas que aparecem na porção superior do gel (próximas ao fago γ, de 500 pb) puderam ser identificadas como fitas simples (que ainda não haviam renaturado).

Esta identificação foi feita por comparação com amostras mantida em condições de SSCP (single-stranded conformational polimorphism), em que as fitas do DNA se separam e apresentam migração mais lenta (Fig. 5). A ausência de formação de heteroduplex aconteceu em todas as amostras do grupo controle e do grupo teste.

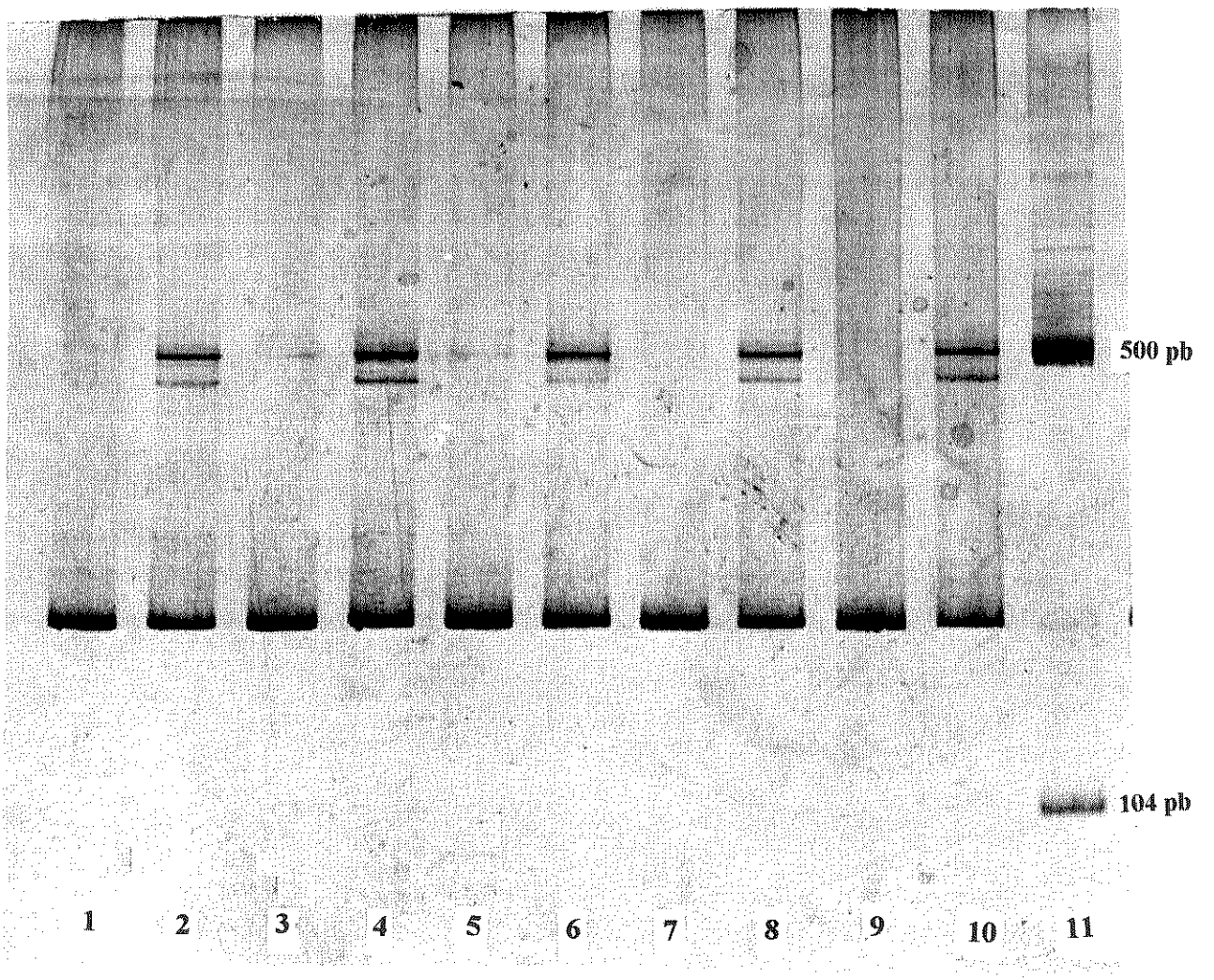

Figura 4. Eletroforese de fragmentos de DNA em gel de poliacrilamida/TBE a 6%, corado pela prata. Canaletas 1, 3, 5, 7 e 9: fragmentos de 200 pb amplificados a partir das amostras GN8, GN9, GN10, GN11 e GN12 (controles), respectivamente. Canaletas 2, 4, 6, 8 e 10: fragmentos de 200 pb amplificados a partir das amostras GN8, GN9, GN10, GN11 e GN12, respectivamente, mas submetidos a condições de formação de heteroduplex previamente à eletroforese. Canaleta 11 contém padrões de peso molecular: ao alto, fragmento de 500 pb do fago λ; embaixo, fragmento de 104 pb do gene da β-globina.

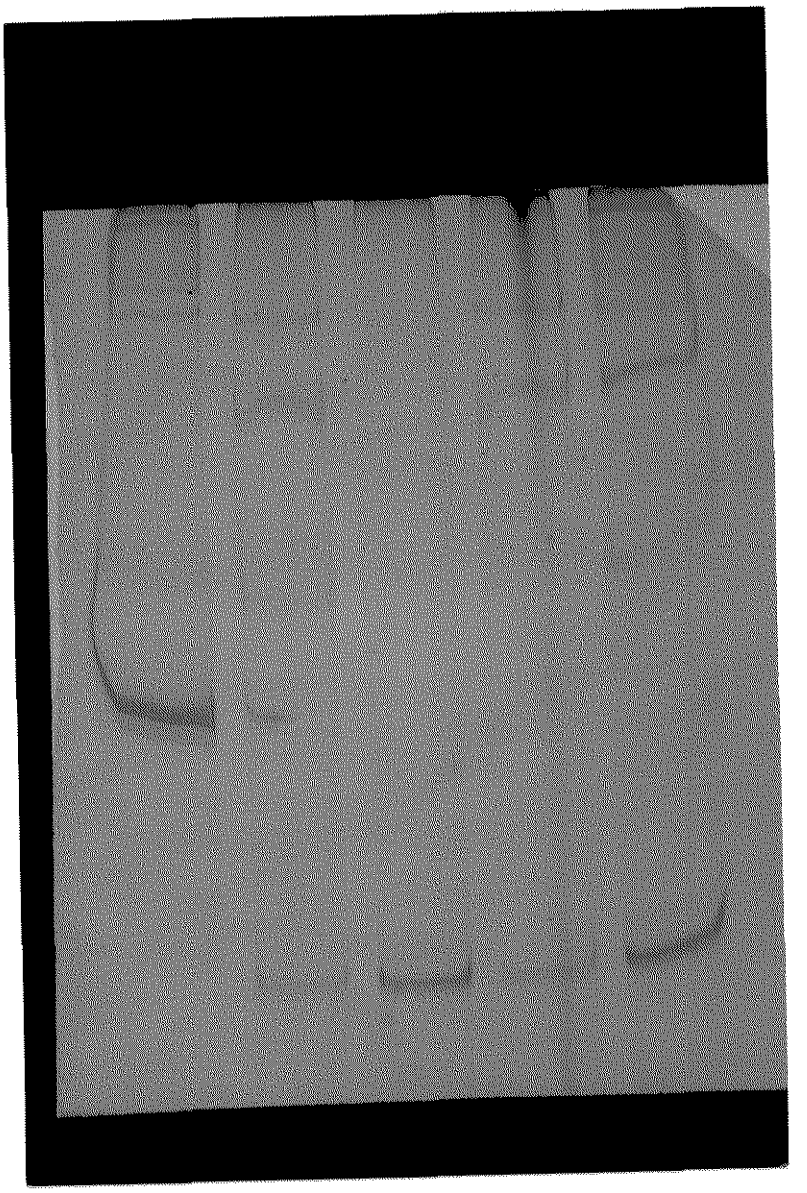

Figura 5. Eletroforese de fragmentos de DNA em gel de poliacrilamida/TBE a 6%, corado pela prata. Canaletas 1: padrão de peso molecular, fragmento de 500 pb do fago λ.
Canaleta 2: fragmentos de 200 pb amplificados a partir da amostra GN5, após reação para formação de SSCP.
Canaleta 3: fragmentos de 200 pb amplificados a partir de GN5.
Canaletas 4 e 5: fragmentos de 200 pb amplificados a partir das amostras GN5 e GN1, respectivamente, mas submetidos a condições de formação de heteroduplex previamente à eletroforese.

A digestão das amostras pelas enzimas de restrição foi efetiva em todas as amostras dos dois grupos. Isso pode ser visto nas Fig. 6 e Fig. 7. Na Fig. 6 o DNA das amostras não havia sido digerido com enzimas de restrição previamente a PCR, e estão evidentes as bandas correspondentes ao fragmento de 461 pb amplificado. Na eletroforese mostrada na Fig.7, as mesmas amostras haviam sido digeridas pela HAPII, e nenhuma banda é evidente.

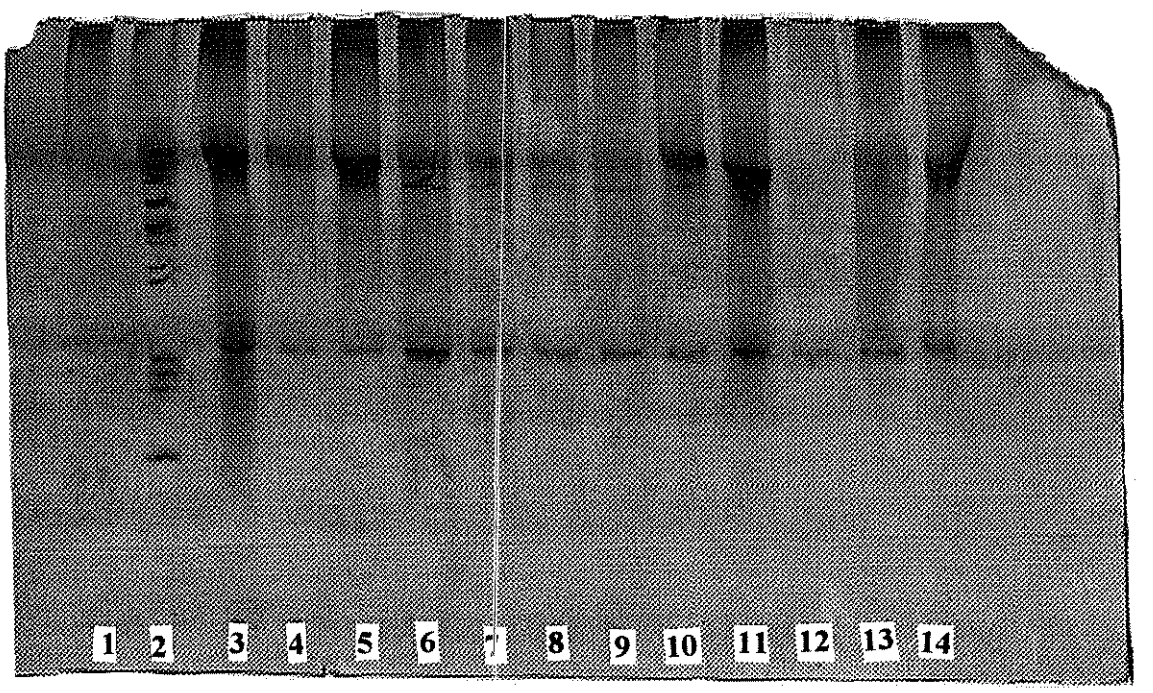

Figura 6. Eletroforese de fragmentos de DNA em gel de poliacrilamida/TBE a 6%, corado pela prata. Canaletas 1: Reação controle sem DNA. Canaleta 2: padrão de peso molecular φX 174, cujas bandas representam 1358 pb, 1078 pb, 874 pb, 603 pb, 310 b, 281 pb, 271 pb e 234 pb (do alto do gel para baixo).
Canaletas 3 a 14: fragmentos compatíveis com 461 pb, amplificados a partir das amostras GN1 (Canaleta 3), GN2, GN3, GN4, GN5, GN6, GN7, GN8, GN9, GN10, GN11 e GN12, respectivamente.

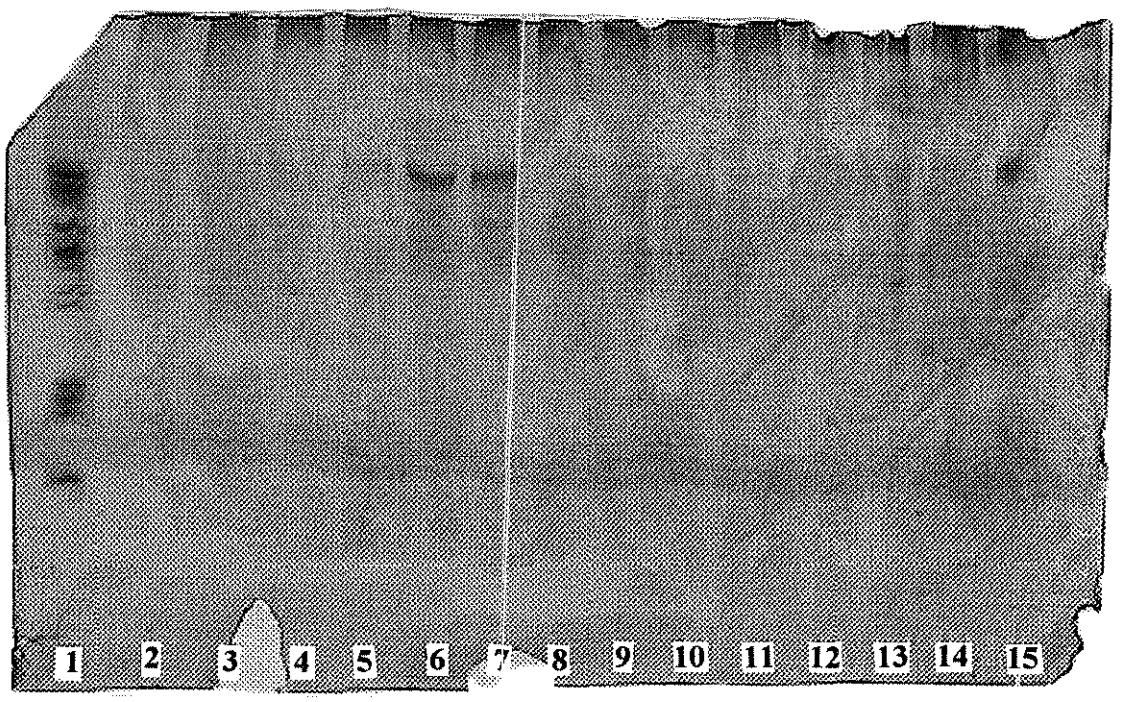

Figura 7. Eletroforese de fragmentos de DNA em gel de poliacrilamida/TBE a 6%, corado pela prata. Canaletas 1: padrão de peso molecular φX 174, cujas bandas representam 1358 pb, 1078 pb, 874 pb, 603 pb, 310 b, 281 pb, 271 pb e 234 pb (do alto do gel para baixo).
Canaletas 2 a 13: amplificações das amostras GN1 (Canaleta 3), GN2, GN3, GN4, GN5, GN6, GN7, GN8, GN9, GN10, GN11 e GN12, respectivamente, digeridas com a enzima de restrição HPA II previamente a PCR. Nenhuma amplificação teve sucesso.
Canaletas 14 e 15: controle da reação de PCR (sem DNA).

Embora não tenhamos colocado as figuras correspondentes a todas as amostras, não houve formação de heteroduplex em nenhuma das amostras, assim como todas foram efetivamente digeridas pelas enzimas de restrição.

DISCUSSÃO

A análise de heteroduplex se baseia no anelamento entre fitas simples com seqüências muito similares, ou seja, cópias quase idênticas de um gene ou fragmento de DNA, formando duplas fitas que não ficam totalmente pareadas e, por este motivo, apresentam mobilidade alterada durante uma eletroforese em gel quando comparadas com as fitas duplas perfeitamente pareadas ou homoduplexes (gerados a partir de genes ou fragmentos idênticos). Moléculas de heteroduplex com variação de apenas 1 pb podem demonstrar mobilidade alterada quando esta é comparada com aquela de homoduplexes em géis de poliacrilamida (WHITE, 1992[77]). Verificou-se que esta técnica é capaz de alcançar um nível de sensibilidade de 80 a 90% em fragmentos de DNA pequenos (< do que 300 pb)(GROMPE, 1993[23]), de modo que podemos considerar esta técnica adequada para nosso estudo, que avaliou a formação de heteroduplexes em fragmentos de 199pb e 204 pb.

A análise de heteroduplex realizada neste estudo revelou ausência de formação de heteroduplexes em todas as amostras testadas. Este resultado é uma indicação de que a seqüência do promotor do COL1A2 analisada é altamente conservada e mutações ou polimorfismos parecem não existir nas amostras estudadas. Possivelmente este fato esteja relacionado com a conservação dos promotores dos genes dos dois tipos de cadeia de colágeno tipo I, que se mostram muito semelhantes em termos de conservação das seqüências "cis". Esta conservação das seqüências "cis" do promotor foi atribuída à regulação da proporção 2:1 na síntese das cadeias alfa 1 e alfa 2 (KARSENTY & DE CROMBRUGGHE, 1991[34]).

Conforme dito na introdução, há evidências que indicam que o controle transcricional representa a forma de regulação mais importante dos genes do colágeno tipo I (BORNSTEIN, 1996[9]). A este nível, sua expressão pode ser influenciada por vários fatores exógenos (VUUST *et al.*, 1985[76]; HÄMÄLÄINEN *et al.*, 1985[25]; COCKAYNE *et al.*,

1986[15]) ou citocinas, como TGF-β, TNF-α e IL-1 (GOLDRING *et al.*, 1986[22]), que interagem com fatores de transcrição a nível de promotores dos genes das cadeias de colágeno.

INAGAKI *et al.*, em 1994[27], mostraram que o TGF-β estimula a transcrição do gene COL1A2 pela ligação de fator de transcrição em seqüência GGGCGG localizada entre -330 e -255 pb. TAMAKI *et al.*, em 1995[68], demonstraram a presença de um elemento fortemente responsivo em uma região rica em GC entre -303 e -271 pb, a qual contém três sítios de ligação (GC-boxes). Mutações por substituição na região das "GC-boxes" aboliram a ligação protéica a estes sítios em ensaios de "gel shift analysis", resultando também em 90% de redução da atividade do promotor em ensaios de transfecção transitórios. CHUNG *et al.*, em 1996[14], estudaram a regulação da atividade do promotor do gene COL1A2 através da transfecção de fibroblastos com porções deste promotor. Estes autores caracterizaram um fragmento entre os nucleotídeos -265 e -241 pb do promotor como um sítio ligador de AP-1. Utilizando mutagênese sítio-dirigida, estes autores também demonstraram que esta região tem uma função regulatória na atividade basal do promotor e é fundamental para a resposta ao TGF-β. Segundo o resultados destes autores, este sítio de AP-1 parece ser suficiente para mediar o efeito inibitório de TNF-α sobre o aumento da expressão do COL1A2 causado pelo TGF-β. É interessante notar também que o complexo AP-1 é um dímero dos produtos gênicos das famílias de oncogenes Fos e Jun. Conforme a especificidade do oncogene formador do dímero, o complexo AP-1 passa a ter uma função inibitória sobre a síntese de colágeno que, pelo mesmo AP-1, está associada há um aumento da atividade de transcrição dos genes de colagenases (MAUVIEL, 1993[45]).

O fato de se estudar sítios com afinidade por citocinas revela não só o papel fundamental destas moléculas na regulação do colágeno do tipo I, mas a maneira complexa como elas regulam todos os processos da matriz extracelular. O TGF-β é considerado uma citocina chave no reparo tecidual (COTRAN *et al.*, 1994[17]). Ele pode ser considerado um

fator anabólico, pois estimula a proliferação de fibroblastos, aumenta a produção de colágeno e inibe a síntese de colagenase (IGNOTZ *et al.*, 1987[26]). O TNF-α, por outro lado, se contrapõe às ações do TGF-β, induzindo a síntese metalo-proteinases e inibindo a produção de colágeno (INAGAKI *et al.*, 1994[27]).

Foram demonstradas as ações opostas exercidas pelo TGF-β e pelo TNF-α na regulação da transcrição do COL1A2 através de uma região curta do promotor, de -340 a -285 pb (INAGAKI *et al.*, 1995[29]). O efeito antagônico destas duas citocinas nesta porção do promotor é, até o momento, a indicação mais clara da maneira pela qual as células de diferentes tecidos e células em diferentes estados funcionais são capazes de exercer um controle muito delicado da síntese de colágeno tipo I. Esta evidência foi muito importante para a escolha do sítio do promotor que nos propusemos a estudar. Uma mutação nesta seqüência alteraria a interação destas importantes citocinas com o promotor e poderia acarretar alterações dramáticas na transcrição do gene.

Por outro lado, também há evidência de regulação negativa em uma região entre -165 pb e -155 pb no promotor do COL1A2, cuja mutação em 3 pb é responsável por um aumento de 4 vezes na atividade do promotor (KARSENTY & CROMBRUGGHE, 1991[34]). Esta seqüência também fazia parte do fragmento que nos propusemos a estudar. Como explicado acima, uma mutação nesta seqüência responsável pela regulação negativa poderia aumentar muito a produção do colágeno tipo I.

Além destas evidências moleculares sobre a topografia do promotor, dados de células em cultura nos influenciaram na formulação da hipótese que motivou este estudo. Foi demonstrada atividade aumentada no promotor do COL1A2 em fibroblastos originários de pacientes com escleroderma (KIKUCHI, 1992[36]), o que indica a possibilidade de polimorfismos na seqüência do promotor estarem relacionados a condições fibróticas por alteração da afinidade a fatores de transcrição.

Antes de concluir a discussão sobre a ausência de polimorfismo ou mutação

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

verificadas na porção do promotor estudada, é importante salientar que há uma diferença importate para esta discussão que diz respeito ao conceito de mutação e polimorfismo (LEWIN, 1994[42]). As mutações genéticas, longe de serem sempre deletérias, são o evento responsável pela evolução dos organismos gerada pela diversidade genética (claro que associadas à seleção natural). A diferença entre mutação e polimorfismo está na freqüência da alteração genética em uma determinada população. Enquanto se fala em mutação para alterações relativamente raras no genoma, fala-se de polimorfismo quando esta mesma modificação aparece em mais de 1% da população. Na verdade, como certas mutações acabam sendo benéficas para determinadas populações, elas passam a ser mais prevalentes e se tornam polimorfismos. A distinção entre os dois termos somente tem importância conceitual para este texto, uma vez que antes do estudo não sabíamos se encontraríamos alguma alteração (como de fato não encontramos). Realmetne importante é a noção de que alterações no genoma (mutações ou polimorfismos) existem e afetam a resposta dos indivíduos a estímulos do meio. Um exemplo muito freqüentemente usado é o polimorfismo da β-globina em africanos (anemia falciforme): como os heterozigotos (com traço falcêmico) apresentam maior resistência à malária, surgiu o polimorfismo a partir da mutação da globina. Este aparte sobre conceitos genéticos é incluído aqui para lembrar das inúmeras possíveis variações interindividuais que poderiam ter um papel na FGH. Hoje já se reconhece que a diferente suscetibilidade dos indivíduos à doença periodontal, por exemplo, provavelmente esteja relacionada a polimorfismos interindividuais (OFFENBACHER, 1996[52]). Um polimorfismo do promotor do TNF-α, por exemplo, uma citocina inflamatória que em geral promove a degradação periodontal, faz com que os indivíduos com o promotor polimórfico tenham uma resposta inflamatória muito menos intensa do que os normais à agressão decorrente do fumo, modulando de um modo inesperado a resistência de fumantes à doença periodontal (DERKX, 1995[18]; OFFENBACHER, 1996[52]).

Tendo em vista tudo o que revisamos sobre regulação dos genes do colágeno do

tipo I, mutações ou polimorfismos nas seqüências do promotor poderiam causar alterações nas respostas aos estímulos. Uma última constatação clínica sugere esta relação nos casos de fibromatose gingival: na fibromatose gengival induzida por drogas, parece haver uma reação exagerada dos tecidos periodontais aos estímulos inflamatórios oriundos de placa dental. É recomendação fundamental o controle escrupuloso da placa após as gengivectomias que são feitas nestes casos, sendo o crescimento genvival posterior à gengivectomia inversamente proporcional à quantidade de placa acumulada (PINDGORG, 1992[55]). Por outro lado, há um certo número de pacientes que não desenvolve o crescimento gingival em resposta a drogas como a fenitoína (PINDGORG, 1992[55]). Isso poderia ser decorrente de polimorfismos individuais que determinassem uma resposta diferente às citocinas ou às drogas.

Apesar da fundamentação de nossa hipótese nos estudos que descrevemos, pode-se concluir que mutações na seqüência do promotor do COL1A2 analisada parecem não estar relacionadas com o excesso de deposição de colágeno do tipo I em pacientes portadores de FGH.

A alta conservação da seqüência do promotor analisada, entretanto, é uma achado importante à medida que se pergunta: se não é a alteração do promotor que leva a produção aumentada de colágeno nas fibromatoses, o que pode ser então?

Neste sentido, alguns trabalhos recentes parecem ter convergido para a hipótese de alteração na quantidade de citocinas. NAKAO *et al*[51]., em 1995, detectaram produção aumentada de citocinas e colágeno em fibroblastos gengivais de pacientes com hiperplasia fibrosa induzida por uso de dentadura, o que indica que talvez a alteração possa estar relacionada à produção de citocinas. Diferentes indivíduos responderiam a determinados estímulos (no caso do estudo referido acima, o trauma por prótese) produzindo diferentes quantidades de citocinas. SAITO *et al.*[61], em 1996, mostraram que havia maior marcação imunohistoquímica para TGF-β, bFGF (Fibroblast Growth Factor) e seus receptores em

tecidos gengivais de pacientes com fibromatose gengival induzida por drogas do que nos tecidos de pacientes controles, levando estes autores a sugerir que a síntese aumentada destas citocinas e seus receptores poderiam estar relacionadas com a hiperplasia gengival induzida por drogas. TIPTON *et al.*[71], em 1997, mostraram que fibroblastos derivados de gengiva de pacientes com FGH têm aumento na sua proliferação e aumento na síntese de colágeno tipo I e fibronectina, quando comparados com fibroblastos derivados de gengivas normais, o que levou os autores a concluir que os fibroblastos de pacientes com FGH exibem características fenotípicas de fibroblastos ativados. A ativação dos fibroblastos poderia decorrer do aumento de citocinas como o TGF-β, mas, ao que sabemos, esto ainda não foi investigado na FGH.

É um fato estabelecido que a desmetilação de genes permite que estes sejam transcritos e as proteínas por eles codificadas passem a se expressar (CEDAR, 1988[11]). No casi das condições fibróticas, poderia-se pensar que em indivíduos normais a região do promotor estivesse mais metilada do que aquela de pacientes com FGH. Esta hipótese já foi confirmada em alguns experimentos *in vitro* envolvendo a expressão de colágeno do tipo I. Foi demonstrado que a metilação de plasmídios contendo os genes COL1A1 and COL1A2 inibiu a transcrição destes genes em células (GUENETTE *et al.*, 1992[24]). Além disso, o tratamento de células com um inibidor de metilação ativou a transcrição do gene COL1A1 (THOMPSON *et al.*, 1991[69]).

Nossos resultados indicam que as citosinas presentes nas seqüências reconhecidas pelas enzimas de restrição HAL III e HPA II não estão metiladas em nossas amostras, uma vez que o DNA não pôde ser amplificado após a digestão com estas enzimas. Deste modo, uma alteração no padrão de metilação na seqüência do promotor estudada aparentemente não está envolvida na gênese da FGH. Contudo, o fato de se ter estudado a seqüência do promotor mais importante do ponto de vista de seqüências de DNA com afinidade por fatores de transcrição não quer dizer que a metilação não esteja envolvida na expressão

aumentada deste gene, pois há outros trechos em que ela poderia estar exercendo um papel regulador importante.

Vale aqui ressaltar que a metilação é uma das modificações covalentes do DNA à qual se tem dado mais atenção nos últimos anos pelos poderosos efeitos que exerce sobre a regulação da transcrição (KASS *et al.*, 1997[35]). Conforme KASS *et al.*[35], em 1997, a metilação do DNA poderia controlar a atividade gênica tanto a nível local, exercendo seus efeitos junto ao promotor e enhancer, ou seja, impedindo a ligação dos fatores de transcrição necessários ao início da transcrição (hipótese que testamos neste estudo), como poderia ser importante ao longo de todo o gene, diminuindo a velocidade de transcrição. Apesar dos resultados negativos de nosso estudo, as evidências de outros trabalhos com promotor dos genes do colágeno tipo I (FERNANDEZ *et al.*, 1985[21]; THOMPSON *et al.*, 1991[69]; GUENETTE *et al.*, 1992[24]) e o aumento do número de indicações sobre a importante função da metilação na regulação da transcrição gênica (LEWIN, 1994[42]; KASS *et al.*, 1997[35]) fazem supor que estudos mais minuciosos a respeito da metilação dos genes do colágeno do tipo I seriam de valor para a compreensão de processos fibróticos com aumento deste colágeno.

CONCLUSÕES

No presente estudo não foram encontrados polimorfismos na região entre -340 e +21 pb do promotor do COL1A, tanto em pacientes normais como em portadores de FGH.

Este achado pode refletir o fato de que condições fibróticas talvez não sejam causadas por alterações nas seqüências dos genes (cis-acting sequences), mas por fatores que contribuem ou determinam sua transcrição (trans-acting factors).

Não foi verificada alteração no padrão de metilação da seqüência do promotor analisada. Provavelmente a submetilação da seqüência analisada não esteja relacionada com a FGH.

Apesar dos resultados deste trabalho não terem contribuído diretamente para esclarecer a causa da FGH, a ausência de mutação ou polimorfismos na seqüência analisada é uma observação importante que indica a necessidade de melhor compreensão dos demais fatores (trans-acting) presentes em condições fibróticas.

SUMMARY

There is a great interindividual variation in gingival fibroblasts capacity for synthesizing extracellular matrix proteins. This variability is well-documented in patients exhibiting drug-induced gingival overgrowth, but it is still poorly understood in patients with Hereditary Gingival Fibromatosis (HGF). There is an increase in the amount of normal collagen secreted into the extracellular matrix of the gingiva of patients with HGF. Individuals may carry genetic polymorphisms or mutations, which could determine the pattern of fibroblasts response to environmental stimuli.

Thus, we tried to identify genetic polymorphisms in the promoter of the collagen type I alfa 2 chain (COL1A2) in a group of normal subjects (n=12) and another group of patients with HGF (n=13). Besides, we also tested the hypothesis that undermethylation of this sequence could be related to the overexpression of type I collagen in these patients.

Inicially we amplified the COL1A2 promoter region from -340 to +2 bp by PCR, since this is the promoter region were most cis-acting-factors have been identified until now. Thereafter, heteroduplex analysis was performed by heating the samples 5 minutes to 98°C, chilling at O°C, and maintaining them one hour at 20°C. The samples were run in a 6% polyacrilamide/ TBE gel, which was stained with silver for heteroduplexes detection. Methylation analysis was carried out using restriction enzymes which do not cut DNA when their recognition sites are methylated (HAL III e HPA II). DNA was digested by these enzymes prior to PCR. Successful amplification of a selected fragment of the promoter where restriction sites of these two enzymes are found would mean that the sequence was methylated. The samples were run in a 6% polyacrilamide/ TBE gel, which was stained with silver.

There was no difference in the migration of DNA fragments after the heteroduplex reaction, neither methylation pattern alteration was detected between the two groups analysed. This may indicate that mutations or methylation pattern alteration in the promoter region of the COL1A2 reaching from –340 to +2 bp are probably not involved in the gingival overgrowth affecting patients with HGF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1.ALBERTS, B. *et al.* Control of gene expression. *In*: _____. **The Molecular Biology of the Cell**. New York & London, Garland Publishing Inc., 1994. Cap 9, p.410-476.

2.ALBERTS, B. *et al.* Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. *In*: _____. **The Molecular Biology of the Cell.** New York & London, Garland Publishing Inc., 1994. cap.19, p.949-1010.

3.BARROS, S.P. **Fibromatose Gingival Hereditária - aspectos morfológicos e ultraestruturais.** Piracicaba, 1991. 49p.[Tese (mestrado) - FOP-UNICAMP]

4.BARTOLD, P.M. *et al.* The biochemistry and Physiology of the periodontium. *In:* WILSON, T.G. & KORNMAN, K.S. **Fundamentals of Periodontics.** Carol Stream, Quintessence Publishing Co., 1996. cap. 6, p.61-108.

5.BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal disease. **J. Periodontol.**, Chicago, **64**(5): 474-484, May 1993.

6.BOAST, S. *et al.* Functional analysis of cis-acting DNA sequences controlling transcription of the human type one collagen genes. **J.Biol. Chem.**, Bethesda, **265**(22): 13351-13356, Aug. 1990.

7.BORNSTEIN, P. *et al.* Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional control of the human α1(I) collagen gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84**: 8869-8873, 1987.

8.BORNSTEIN, P. & MCKAY, J. The first intron of the α1(I) collagen gene contains several transcriptional regulatory elements. **J.Biol. Chem.**, Bethesda, **263**(4): 1603-1606, Feb. 1988.

9.BORNSTEIN, P. Regulation of expression of the α1(I) collagen gene: A critical appraisal of the role of the first intron. **Matrix Biol.**, Stuttgart, **15**(1): 3-10, 1996.

10.BOZZO, L. *et al.* Hereditary gingival fibromatosis: report of an extensive four-generation pedigree. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Saint Louis, **78**(4): 452-454,Oct. 1994.

11.CEDAR, H. DNA methylation and gene activity. **Cell 53**: 3-4, 1988.

12.CHU, M.-L. *et al.* Human pro α1(I) collagen gene structure reveals evolutionary conservation of a pattern of introns and exons. **Nature**, London, **310**: 337-340, 1984.

13.CHU, M.-L. *et al.* Fine Structural Analysis of the Human Pro-α1(I) Collagen Gene. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, **260** (4): 2315-2320, Feb. 1985.

14.CHUNG, K.-Y. *et al.* An AP-1 binding sequence is essencial for regulation of the human α2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming rowth factor-β. **J. Biol. Chem.**,Bethesda, **271**(6): 3272- 3278, Feb. 1996.

15.COCKAYNE, D. *et al.* Glucocorticoids decrease the synthesis of type I collagen mRNAs. **Biochemistry 25**: 3202-3209, 1986.

16.COLLAN, Y. *et al.* Histochemical and biochemical study of hereditary fibrous hyperplasia of the gingiva. **Scand. J. Dent. Res.,** Copenhagen, **90**(1): 20-28, Feb.1982.

17.COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Inflammation and Repair. *In:* _____. **Robbins pathologic basis of disease**. 5.ed. Philadelphia, Saunders, 1994. cap.3, p.51-92.

18.DERKX, H.H.F. *et al.* Familial differences in endotoxin-induced TNF release in whole blood and peripheral blood mononuclear cells in vitro; relationship to TNF gene polymorphism. **J. Endotox. Res. 2**: 19-25, 1995. *Apud* OFFENBACHER, S. Periodontal diseases: pathogenesis (review). **Ann. Periodontol. 1**(1): 821-878, 1996.

19.DICKSON, L.A. *et al.* Analysis of the promoter region and the N-propeptide domain of the human α2(I) collagen gene. **Nucleic Acid Res,** Oxford, **13**(10): 3427-3438, Oct. 1985.

20.EVERTS, V. *et al.* Metalloproteinases are not involved in the phagocytosis of collagen fibrils by fibroblasts. **Matrix 9**: 266-276, 1989.

21.FERNANDEZ, M.P.; YOUNG, M.F.; SOBEL, M.E. Methylation of type II and I collagen genes in differentiated and dedifferentiated chondrocytes. **J.Biol. Chem.,** Bethesda, **260**(4): 2374-2378, Febr. 1985.

22.GOLDRING, M.B. Immune interferon supresses levels of procollagen mRNA and type II collagen synthesis in cultured human articular and costal chondrocytes. **J. Biol. Chem.,** Bethesda, **261**(19): 9049- 9056, July 1986.

23.GROMPE, M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. **Nature Genetics 5**: 111-117, 1993.

24.GUENETTE, D.K. DNA methylation inhibits transcription of procollagen α2(I) promoters. **Biochem. J. 283**: 699-703, 1992.

25.HÄMÄLÄINEN, L.; OIKARINEN, J.; KIVIRIKKO, K.I. Synthesis and degradation of type I procollagen mRNA in cultured human skin fibroblasts and the effect of cortisol. **J. Biol. Chem.,** Bethesda, **260**(2): 720-725, Jan. 1985.

26.IGNOTZ, R.A.; ENDO, T.; MASSAGUÉ, J. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor β. **J. Biol. Chem.,** Bethesda, **262**(15): 6443-6446, May 1987.

27.INAGAKI, Y.; TRUTER, S.; RAMIREZ, F. Transforming growth factor-β stimulates α2(I) collagen gene expression through a cis-acting element that contains an Sp1-binding site. **J. Biol. Chem.,** Bethesda, **269**(20): 14828-14834, May 1994.

28.INAGAKI, Y. *et al.* Overlapping pathways mediate the opposing actions of tumor necrosis factor-α and transforming growth factor-β on α2(I) collagen gene transcription. **J.Biol. Chem.,** Bethesda, **270**(7): 3353-3358, Feb. 1995.

29.INAGAKI, Y. *et al.* Regulation of the α2(I) collagen gene transcription in fat-storing cells derived from a cirrhotic liver. **Hepatology 22**(2): 573-579, Feb. 1995.

30.JIMENEZ, S.A. *et al.* Functional analysis of human α1(I) procollagen gene promoter. **J.Biol. Chem.,** Bethesda, **269**(17): 12684-12691, Apr.1994.

31.JOHNSON, B.M. *et al.* A defect in fibroblasts from an unidentified syndrome with gingival hyperplasia as the predominant feature. **J. Periodont. Res.,** Copenhagen, **21**(4): 403-413, Jul. 1986.

32.JORGESON, R.J. & COOCKER, M.E. Variation in inheritance and expression of gingival fibromatosis. **J. Periodontol.,** Chicago, **45**(7): 472-477, July 1974.

33.JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 8.ed. São Paulo, Guanabara Koogan, 1995.

34.KARSENTY, G. & DE CROMBRUGGHE, B. Conservation of binding sites for regulatory factors in the coordinately expressed α1(1) and α2(1) collagen promoters. **Biochem Biophys Res Comm 177**(1): 538-544, May 1991.

35.KASS, S.U.; PRUSS, D.; WOLFFE, A.P. How does DNA methylation repress transcription? **TIG,** London, **13**(11): 444-449, Nov. 1997.

36.KIKUCHI, K. *et al.* Direct demonstration of transcriptional activation of collagen gene expression in systemic sclerosis fibroblasts: insensitivity to TGF-β1 stimulation. **Biochem Biophys Res Comm 187**(): 45-50, 1992.

37.KILPINEN, E.; RAESTE, A.M.; COLLAN, Y. Hereditary gingival hyperplasia and physical maturation. **Scand. J. Dent. Res.,** Copenhagen, **86**(2):118, Mar. 1978.

38.KRATOCHWIL, K. et al. Retrovirus-induced insertional mutation in Mov13 mice affects collagen I expression in tissue-specific manner. **Cell 57**: 807, 1989.

39.LABAND, P.F.; HABIB, G.; HUMPREYS, G.S. Hereditary gingival fibromatosis: report of an affected family with associated splenomegaly and skeletal and soft tissue anormalities. **Oral Surg. Oral Pathol. Oral Surg.,** Saint Louis, **17**(3): 339-351, Mar. 1964.

40.LAWTON, G. *et al.* Human papillomaviruses in normal oral mucosa: a comparison of methods for sample collection. **J. Oral Pathol.,** Copenhagen, **21**(7): 265-269, July 1992.

41.LENCH, N.; STAINER, P.; WILLIAMSON, R. Simple non-invasive method to obtain DNA for gene analysis. **Lancet 18**: 1356-1358, 1988.

42.LEWIN, B. **Genes V.** 5.ed. Oxford, Oxford University Press, 1994. 1072p.

43.LI, L. *et al.* Positive regulation of human α1(I) collagen promoter activity by transcription factor Sp1. **Gene 164**: 229-234, 1995.

44.MACHADO, M.A.N. **Análise dos heredogramas e das correlações clínicas da Fibromatose Gingival Hereditária em uma família de 219 pessoas.** Piracicaba, 1996. 85p. [Tese(Mestrado) - FOP-UNICAMP]

45.MAUVIEL, A.J. Opposite effects of TGF-β and TNF-α on collagenase gene expression. **J. Cell. Biochem. 53**: 288-295, 1993.

46. MCKEON, C. *et al.* Unusual methylation pattern of the α2(I) collagen gene. **Cell 29**: 203-210, 1982.

47.MCKEVITT, K.M.B. & IRWIN, C.R. Phenotypic differences in growth, matrix synthesis and response to nifedipine between fibroblasts derived from clinically healthy and overgrown gingival tissue. **J. Oral Pathol.**,Copenhagen, **24**(1): 66-7, Jan. 1995.

48.MONTES, G.S. & JUNQUEIRA, L.C. Biology of collagen. **Rev. Can. Biol. Experiment. 41**: 143-156, 1982.

49.MUÑOZ, E. *et al.* Stimulation of α1(I) procollagen gene expression in NIH-3T3 cells by the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax gene. **J. Clin. Invest. 96**: 2413-2420, 1995.

50.NAGAMINE, C.M.; CHAN, K.; LAU, Y.F.C. A PCR artifact: generation of heteroduplexes. **Am. J. Hum. Genet. 45**: 337-339, 1987.

51.NAKAO, K.; YONEDA, K.; OSAKI, T. Enhanced cytokine production and collagen synthesis of gingival fibroblasts from patients with denture fibromatosis. **J. Dent. Res.**, Alexandria, **74** (4): 1072-1078, Apr. 1995.

52.OFFENBACHER, S. Periodontal diseases: pathogenesis (review). **Ann. Periodontol. 1**(1): 821-878, 1996.

53.OIKARINEN, K. *et al.*Hereditary gingival fibromatosis associated with growth hormone deficiency. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, London, **28**(5): 335-339, Oct. 1990.

54.OSTWALD, C. *et al.* Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal mucosa. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, **23**(5): 220-225, May 1994.

55.PINDBORG, J.J. Manifestações de doenças sistêmicas no periodonto. *In:* LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica.** 2.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992. Cap.10, p.203-214.

56.PROSSER, J. Detecting single-base mutations. **TibTech. 11**: 238-246, 1993.

57.RAMIREZ, F. *et al.* Isolation and characterization of human fibrillar collagen genes. **Ann. N. Y. Acad. Sci. 460:** 117-129, 1985.

58.RAMIREZ, F. & DI LIBERTO, M. Complex and diversified regulatory programs control the expression of vertebrate collagen genes. **FASEB J. 4**: 1616-1623,1990.

59.ROSSOUW, C.M.S. *et al.* DNA sequences in the first intron of human pro-α1(I) collagen gene enhance transcription. **J. Biol. Chem.,** Bethesda, **262**(31): 15151-15157, Nov. 1987.

60.SALLUM, E.A. **Análise morfométrica do tecido conjuntivo da Fibromatose Gingival Hereditária e da gengiva clinicamente normal - estudo comparativo**. Piracicaba, 1993. 85p. [Tese(Mestrado) - FOP-UNICAMP]

61.SAITO, K. *et al.* 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,** Copenhagen **31**(8): 545-555, Nov. 1996.

62.SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994. 2265p.

63.SHIRASUNA, K. *et al.* Abnormal cellular property of fibroblasts from congenital gingival fibromatosis. **J. Oral Pathol.,** Copenhagen, **17**(8): 381-385, Sep.1988.

64.SIMKEWICH, C.P. *et al.* The transcriptional tissue specificity of the human pro α2(I) collagen gene is determined by a negative cis-regulatory element in the promoter. **Biochem. J. 286**: 179-185, 1992.

65.SINGER, S.L. *et al.* Hereditary gingival fibromatosis with a recessive mode of inheritance. Case reports. **Austr. Dent. J.,** St. Leonards, **38**(6): 427-432, Nov. 1993.

66.SYKES, B. Bone disease cracks genetics. **Nature 348**: 18-19, 1990.

67.TAKAGI, T. *et al.* Heterogeneity in the gingival fibromatosis. **Cancer,** Danvers, **68**(10): 2202-2212, Nov. 1991.

68.TAMAKI, T. *et al.* Characterization of a GC-rich region containing Sp1 binding site(s) as a constitutive responsive element of the α2(I) collagen gene in human fibroblasts. **J. Biol. Chem.,** Bethesda, **270**(9): 4299-4304, Mar. 1995.

69.THOMPSON JP. *et al. In vitro* methylation of the promoter and enhancer of pro α1(I) collagen gene leads to its transcriptional inactivation. **J. Biol. Chem.,** Bethesda, **266**(4): 2549-2556, Feb. 1991.

70.TIPTON, D.A.; STRICKLIN, G.P.; DABBOUS, M.K. Fibroblast heterogeneity in collagenolytic response to cyclosporine. **J. Cell. Biochem. 46**: 152-165, 1991.

71.TIPTON, D.A.; HOWELL, K.J.; DABBOUS, M.K. Increased proliferation, collagen production, and fibronectin production by hereditary gingival fibromatosis fibroblasts. **J. Periodontol.,** Chicago, **68**(7): 534-530, July 1997.

72.VAN DER REST, M. & GARRONE, R. Collagen family of proteins. **FASEB J. 5**: 2814, 1991.

73. VAN DER ZEE, E.; EVERTS, V.; BEERSTEN, W. Cytokines modulate routes of collagen breakdown. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, **24**: 297-305, 1997.

74. VARGA, J. & JIMENEZ, A.S. Modulation of collagen gene expression: its relation to fibrosis in systemic sclerosis and other disorders. **Ann Intern Med 122**: 60-62, 1995.

75. VUORIO, E. & DE CROMBRUGGHE, B. The family of collagen genes. **Annu. Rev. Biochem. 59**: 837-72, 1990.

76. VUUST, J.; Sobel, M.E.; Martin, G.R. Regulation of type I collagen synthesis. **Eur. J. Biochem. 151**: 449-453, 1985.

77. WHITE, M. B. *et al.* Detecting single base substitutions as heteroduplexes. **Genomics 12**: 301-306, 1992.

78. WYNNE, S.E.; ALDRED, M.J.; BARTOLD, P.M. Hereditary gingival fibromatosis associated with hearing loss and supernumerary teeth: a new syndrome. **J. Periodontol.**, Chicago, **66**(1): 75-79, Jan. 1995.