

Ricardo Della Coletta

**ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DE
COLÁGENO E SUAS PROTEÍNAS *CHAPERONES*,
CITOCINAS E METALOPROTEINASES DE MATRIZ E SEUS INIBIDORES
TECIDUAIS EM FIBROBLASTOS GENGIVAIS DE PACIENTES COM
FIBROMATOSE GENGIVAL HEREDITÁRIA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Odontologia, Área de Biologia e Patologia Buco-Dental,
da Faculdade de Odontologia de Piracicaba,
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Piracicaba
1999

Ricardo Della Coletta

**ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DE
COLÁGENO E SUAS PROTEÍNAS *CHAPERONES*,
CITOCINAS E METALOPROTEINASES DE MATRIZ E SEUS INIBIDORES
TECIDUAIS EM FIBROBLASTOS GENGIVAIS DE PACIENTES COM
FIBROMATOSE GENGIVAL HEREDITÁRIA**

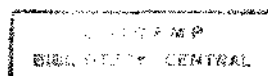
Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 15/07/99

Assinatura do Orientador

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Odontologia, Área de Biologia e Patologia Buco-Dental,
da Faculdade de Odontologia de Piracicaba,
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida

Piracicaba
1999



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
Ex.	
	38644
	229/99
	D ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	01/09/99
N.º CPO	

CM-00125676-7

Ficha Catalográfica

D38a Della Coletta, Ricardo.
Análise da proliferação celular e expressão de colágeno e suas proteínas *chaperones*, citocinas e metaloproteínases de matriz e seus inibidores teciduais em fibroblastos gengivais de pacientes com fibromatose gengival hereditária. / Ricardo Della Coletta. — Piracicaba, SP : [s.n.], 1999.
136p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida.
Tese (Doutorado) — Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Doença periodontal. 2. Fibroblasto. 3. Metaloproteínas. 4. Matriz extracelular. 5. Colágeno. 6. Proliferação celular. I. Almeida, Oslei Paes de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 17 de Junho de 1999, considerou o candidato RICARDO DELLA COLETTA aprovado.

1. Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA

2. Prof. Dr. GYÖRGY MIKLOS BÖHM

3. Profa. Dra. VERA CAVALCANTI DE ARAUJO

4. Prof. Dr. SILVIO SANCHES VEIGA

5. Prof. Dr. LUCIANO RESENDE FERREIRA

DEDICATÓRIA

À **MÁRCIA** pelo incentivo e apoio constantes
que nunca diminuíram durante esta jornada e,
ao jovem Nicholas que em breve estará entre
nós.

Aos meus pais, **OSWALDO e APARECIDA**,
que ainda hoje lutam bravamente por min.

Agradecimentos

Ao ex-diretor Prof. Dr. José Ranali e ao atual diretor Prof. Dr. Antônio Wilson allun da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

Ao ex-coordenador Prof. Dr. Carlos Roberto H. Fortinguerra, e a atual coordenadora Profa. Dra. Darcy O. Tosello do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

Aos Professores da Disciplina de Patologia Bucal Drs. Lourenço Bozzo, Jacks Jorge Junior, Marcio Ajudarte Lopes, Edgard Graner e Pablo Augustin Vargas, pelo companheirismo, estímulo e espírito de união.

Aos colegas da Disciplina de Patologia Bucal Maria Helena de Vasconcelos Peron, Ana Cristina de Amaral Godoy, Rosa Maria Fornasiare e Adriano Luis Martins pela rica convivência e apoio indispensável durante a realização deste trabalho.

Aos professores e colegas da University of Maryland Dental School, nas pessoas do Dr. Jonh J. Sauk, Dr. Bernard Levy, Dr. Mark Reynolds, Mrs. Ramona Parker, Miss Kathy Norris and Miss Carla Hebert, pelo apoio, compreensão e por estarem sempre presentes nos momentos difíceis.

Aos colegas de turma do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES pela concessão da bolsa na modalidade sandwich, processo BEX2489/97-0.

Ao Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA
pelos ensinamentos científicos e humanos
e amizade com que orientou este trabalho
e minha formação acadêmica.

SUMÁRIO

1. Resumo.....	1
2. Abstract.....	3
3. Introdução.....	4
4. Revisão da Literatura	
4.1. Fibromatose Gengival Hereditária.....	6
4.2. Proteínas <i>Chaperones</i> e Proteínas de Choque Térmico.....	9
4.2.1. Síntese Protéica.....	13
4.2.2. Regulação Gênica - Gene de Choque Térmico.....	15
4.2.3. Família Hsp90.....	17
4.2.4. Família Hsp70.....	19
4.2.5. Hsp47.....	22
4.3. Colágeno.....	28
4.4. Metaloproteinase de Matriz.....	30
4.5. Citocinas.....	33
4.5.1. Fator de Crescimento Transformante- β 1.....	34
4.5.2. Interleucina-1 β	35
4.5.3. Interleucina-6.....	36
4.5.4. Fator Necrosante de Tumor- α	37
5. Proposição.....	39
6. Materiais e Métodos	
6.1. Pacientes.....	40
6.2. Cultura primária.....	41
6.3. Subcultura.....	41
6.4. Análise de crescimento celular.....	41
6.5. Ensaio colorimétrico de MTT.....	42
6.6. Coloração de AgNOR.....	42
6.7. Ensaio de incorporação de BrdU.....	43
6.8. Análise imunohistoquímica de PCNA.....	43
6.9. Análise da síntese de colágeno.....	43
6.10. Marcação de proteínas com metionina radiativa.....	44
6.11. Imunoprecipitação.....	44
6.12. Digestão com collagenase bacteriana.....	45
6.13. Ensaio de ligação à gelatina Sepharose 4B.....	45
6.14. Western blot.....	45

6.15. Efeito do tratamento com calor na produção de Hsp47.....	46
6.16. Efeito de inibidores da síntese de colágeno na produção de Hsp47.....	46
6.17. Imunofluorescência e análise por microscopia confocal.....	46
6.18. Pró-peptídeos de colágeno.....	47
6.19. RT-PCR.....	47
6.20. Análise citométrica.....	48
6.21. Análise zimográfica.....	49
6.22. Influência da neutralização de TGF- β 1 na expressão e produção de MMPs e TIMPs.....	49
6.23. Produção de citocinas.....	49
6.24. Análise estatística.....	50
7. Resultados	
7.1. Características clínicas e histológicas.....	51
7.2. Características morfológicas e velocidade de crescimento.....	51
7.3. Análise de proliferação celular.....	52
7.4. Análise dos complexos protéicos durante o processo de maturação de cadeias nascentes de colágeno tipo I.....	53
7.5. Análise da expressão e produção de Hsp47 e colágeno.....	55
7.6. Efeito de NP1 na produção de colágeno tipo I e Hsp47.....	57
7.7. Produção de citocinas por fibroblastos de GN e FGH.....	57
7.8. Expressão de MMPs e TIMPs.....	58
8. Discussão	96
9. Conclusões	108
10. Referências Bibliográficas	109

1. RESUMO

Fibromatose gengival hereditária (FGH) é uma condição rara caracterizada por um aumento gengival generalizado com crescimento lento e progressivo. Para elucidar algumas das características regulatórias que resultam nesta condição, quatro linhagens celulares de fibroblastos provenientes de indivíduos de uma mesma família com FGH foram isoladas e caracterizadas em relação ao comportamento proliferativo, produção e expressão de colágeno e suas proteínas *chaperones*, expressão de MMPs e TIMPs e produção de citocinas. Fibroblastos de gengiva normal (GN) e FGH em condições de subconfluência celular apresentaram típicas características morfológicas, mas em condições de saturação da densidade, os fibroblastos de FGH apresentaram dimensões menores que as células controle. Cinco diferentes ensaios de proliferação celular mostraram que a relação de proliferação foi significativamente maior em fibroblastos de FGH. A produção e expressão de Hsp47 é também aumentada em fibroblastos de FGH em paralelo com o aumento na produção de colágeno. Em adição, a expressão de Hsp47 é regulada por estresse celular e pró-peptídeos correspondendo as regiões da porção N-terminal das cadeias $\alpha 1(I)$. A produção de citocinas foi detectada por ELISA utilizando anticorpos específicos para TGF- $\beta 1$, IL-6, IL-1 β e TNF- α . Em fibroblastos de FGH a produção de TGF- $\beta 1$ e IL-6 foi estatisticamente maior que em fibroblastos normais ($p < 0,013$ e $p < 0,0035$ respectivamente), enquanto que IL-1 β e TNF- α não foram detectadas em todas as linhagens celulares. A expressão e produção de MMP-1 e MMP-2, como revelada por RT-PCR e zimografia, foram significativamente menores em fibroblastos de FGH comparando com células de GN. Por outro lado, a expressão de TIMP-1 e TIMP-2 foi ligeiramente maior em fibroblastos de GN. A neutralização de TGF- $\beta 1$ com anticorpos específicos elevou os níveis de expressão e produção de MMP-1 e dramaticamente reduziu os níveis de MMP-2, enquanto que os níveis de TIMPs não foram alterados. Estes resultados sugerem que a patogênese do aumento gengival de indivíduos com FGH é possivelmente resultado de uma associação de fatores incluindo alterado comportamento proliferativo, exacerbada síntese de

colágeno e Hsp47, desregulação no balanço proteolítico e elevada produção de citocinas.

Palavras Chave: Fibromatose Gengival Hereditária; Proliferação Celular; Colágeno; Hsp47; Metaloproteinases de Matriz; Inibidores de Metaloproteinases de Matriz; Citocinas.

2. ABSTRACT

Characterization of cellular proliferation and expression of collagen and its molecular chaperones, cytokines and matrix metalloproteinases and its tissue inhibitors in gingival fibroblasts from patients with hereditary gingival fibromatosis

Hereditary gingival fibromatosis (HGF) is a rare oral condition characterized by a slow and progressive enlargement of the gingiva, involving both the maxilla and mandible. To further elucidate some of the regulatory features resulting in this condition, the culture characteristics of the four cell lines of gingival fibroblasts derived from patients of the same family with HGF were isolated and characterized on proliferation index, collagen and its molecular chaperones production and expression, MMPs and TIMPs expression, and cytokines production. HGF and normal gingiva (NG) fibroblasts in subconfluent culture densities showed typical morphologic characteristics, but in saturation density, HGF fibroblasts were shorter than NG cells. Five different cell proliferation assays showed that the cell proliferation rate was significantly higher in HGF fibroblasts. The production and expression of Hsp47 were significantly higher in HGF fibroblasts than in NG fibroblasts, along with increased production of collagen. In addition, Hsp47 is coordinately regulated by stress and by feedback mechanism mediated by N-terminal procollagen propeptides corresponding to residues of $\alpha 1(I)$ -chains. The cytokines production was detected by ELISA using specific antibodies for TGF- $\beta 1$, IL-6, IL-1 β and TNF- α . In HGF fibroblasts, the production of TGF- $\beta 1$ and IL-6 was higher than fibroblasts from normal tissues ($p < 0.013$ and $p < 0.0035$ respectively), whereas IL-1 β e TNF- α were not detected in all cell lines. RT-PCR and enzymographic analysis clearly demonstrated that the expression and production of MMP-1 and MMP-2 were significantly lower in fibroblasts from HGF than from NG. Interestingly, TIMP-1 and TIMP-2 expression from NG cells was shown to be slightly higher than those from HGF. The use of neutralizing antibodies to TGF- $\beta 1$ caused a slight increase in MMP-1 and a decrease in MMP-2 expression, whereas that no change TIMPs levels. These results suggest that the pathogenesis of gingival outgrowth in HGF patients is possibly resulted of a association of factors such as increased proliferative potential, altered synthesis of collagen and Hsp47, dysregulated proteolytic balance and increased cytokines production.

Key Words: Hereditary Gingival Fibromatosis; Cellular Proliferation; Collagen; Hsp47; Matrix Metalloproteinases; Matrix Metalloproteinases Inhibitors; Cytokines.

3. INTRODUÇÃO

Fibromatose gengival hereditária (FGH) é uma condição oral rara clinicamente manifestada por um aumento gengival generalizado e fibrótico, podendo apresentar de forma isolada ou associada a outras alterações, como parte de uma síndrome. Como tal, a FGH tem sido descrita em associação a hipertricosose, retardo mental, epilepsia, perda auditiva progressiva e anormalidades das extremidades, particularmente dedos dos pés e mãos. A FGH geralmente apresenta um modo de herança autossômico dominante, contudo, o gene demonstra variáveis graus de penetrância e expressividade. Formas autossômicas recessivas são ocasionalmente relatadas. Histologicamente, a FGH é caracterizada por uma mucosa revestida por epitélio hiperplásico com longas e delgadas criptas epiteliais que se estendem ao tecido conjuntivo, o qual é denso e rico em fibras colágenas. Em adição ao colágeno, FGH e outras hiperplasias gengivais apresentam elevados níveis de outras macromoléculas da matriz extracelular (MEC) como fibronectina e glicosaminoglicanos. Os mecanismos biológicos envolvidos na FGH são desconhecidos, e os resultados de estudos de cultura celulares variam. Fibroblastos derivados da gengiva de pacientes com FGH demonstraram tanto redução quanto aumento no potencial proliferativo e na síntese de colágeno (Johnson et al., 1986; Shirasuna et al., 1989; Oikarinen et al., 1990; Tipton et al., 1997). Embora tenha sido demonstrado que o efeito autócrino do fator de crescimento transformante- β (TGF- β) regula a síntese de colágeno por fibroblastos de FGH (Tipton and Dabbous, 1998), os mecanismos relacionados a ativação desta citocina ainda são incertos.

Tradicionalmente é inferido a produção local de MEC como causa do aumento gengival de pacientes com FGH e hiperplasias gengivais induzidas por drogas. Contudo, recentes estudos demonstraram a igualdade de importância dos mecanismos que regulam a proliferação celular e a síntese e degradação dos componentes da MEC como consequência do acúmulo excessivo de tecido fibroso. A degradação da MEC é principalmente realizada por enzimas do grupo das metaloproteinases de matriz (MMPs). As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco conhecidas pela sua habilidade de degradar várias macromoléculas da MEC. Inúmeras evidências existem para a participação das MMPs em processos normais e patológicos, incluindo embriogênese, reparação, inflamação, câncer e doenças fibróticas. A atividade catalítica das MMPs é regulada a múltiplos níveis, o qual incluem transcrição, tradução, secreção, ativação e inibição. Este último é controlado por membros da família dos inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz

(TIMPs). A expressão gênica é regulada por uma variedade de agentes, incluindo as citocinas TGF- β 1. Em resposta a TGF- β 1, fibroblastos reduzem a produção de MMP-1, enquanto elevam os níveis de expressão e produção de MMP-2, TIMP-1 e colágeno. Outras citocinas foram também demonstradas estarem associadas a regulação destes eventos.

O objetivo deste trabalho é verificar e comparar o potencial proliferativo, a síntese de colágeno e suas proteínas *chaperones*, produção de citocinas e expressão de MMPs e TIMPs em fibroblastos de FGH e GN. A escolha destes fatores baseiam-se nas observações que doenças fibróticas como a FGH, podem ser reflexos de um aumento na proliferação celular, aumento na síntese de ME, desequilíbrio na atividade proteolítica e/ou devido a desregulação nas proteínas reguladoras destes eventos.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. FIBROMATOSE GENGIVAL HEREDITÁRIA

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

O primeiro relato de FGH que se tem conhecimento ocorreu em 1856 com Gross. A partir deste relato, inúmeros outros trabalhos foram publicados caracterizando clínica, histológica, bioquímica e geneticamente a FGH. A FGH é uma condição rara (1:750.000, Singer et al., 1993), de crescimento lento, que manifesta clinicamente por aumento gengival firme, indolor, não hemorrágico, de coloração rósea e pontilhado superficial característico que pode recobrir parcial ou totalmente a coroa dental e que não apresenta tendência a regressão espontânea (Bozzo et al., 1992; 1994). A gravidade do aumento gengival é variável, podendo variar de leve a grave mesmo em indivíduos de uma mesma família (Singer et al., 1993). Este aumento pode ser generalizado, isto é, envolvendo todos os dentes de ambos os arcos, ou parcial, envolver somente um arco ou porções de um arco. O envolvimento localizado é mais freqüente na superfície palatina da tuberosidade maxilar e na superfície lingual da mandíbula.

Há consenso geral que o aumento gengival é proveniente de uma hiperplasia não inflamatória dos elementos do tecido conjuntivo. Densos e numerosos feixes de fibras colágenas mostram-se entrelaçados e permeados por fibroblastos, vasos sangüíneos e ocasionalmente, discreto infiltrado inflamatório. O epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado encontra-se hiperplásico e, profundas e delgadas criptas epiteliais projetam em direção ao conjuntivo subjacente (Redman et al., 1985; Danesh-Meyer and Holborow, 1993). Pequenos e múltiplos focos de calcificação distrófica, ilhas de metaplasia óssea, áreas de ulceração e focos de células inflamatórias também foram descritos (Günhan et al., 1995). Provavelmente, a grande variedade nas alterações histológicas descritas na FGH seja resultado da heterogeneidade clínica e genética da doença.

A FGH é transmitida de forma heterogênea, podendo manifestar de forma isolada ou mais raramente, como componente de uma síndrome. Freqüentemente esta alteração é herdada de forma autossômica dominante, mas formas autossômicas

recessivas também são descritas (Gorlin et al., 1990; Goldblatt and Singer, 1992). A característica síndrome mais comumente observada em associação a FGH é a hipertricose, a qual está ocasionalmente associada a retardo mental e epilepsia. Estas manifestações e outras raras características são descritas na Tabela 1. Nossos pacientes não mostraram nenhuma destas características e apresentaram intelecto normal como demonstrado pela publicação de Bozzo et al. (1994). Na FGH a maioria dos relatos de fenótipos autossômicos recessivos, que são em pequeno número em relação ao fenótipo dominante, segundo alguns autores provém de casamentos consanguíneos. Porém a consangüinidade não é a única e nem a explicação mais aceita. Descendentes de pessoas não aparentadas, cada qual portadora de um gene mutante, parece ser responsável pela maioria dos casos de doenças autossômicas recessivas, principalmente se o carácter recessivo apresentar alta freqüência na população, exemplo disto é a fibrose cística (Thompson et al., 1993).

É aceito que a FGH é uma alteração genética, mas o mecanismo pelo qual o aumento gengival ocorre ainda é desconhecido. O primeiro estudo sugerindo o provável gene alterado na FGH foi recentemente descrito por Hart et al. (1998). Estes autores, estudando uma família com doze membros afetados por FGH através de técnicas de alinhamento genético, identificaram alterações provavelmente relacionadas com a doença no cromossomo 2 entre os locus D2S1788 e D2S441. Contudo, estudos semelhantes na família aqui estudada não confirmaram similar alinhamento cromossômico (Hart TC, comunicação pessoal). A identificação do gene(s) responsável(is) pelo aumento gengival observado em pacientes com FGH e o conhecimento da(s) mutação(ões) resultante por esta alteração, possibilitarão o conhecimento dos eventos biológicos associados a esta alteração, abrindo perspectivas para a terapia definitiva destes pacientes.

Estudos bioquímicos realizados no intuito de caracterizar os principais eventos associados a esta doença são controversos. Evidências experimentais demonstraram que o aumento gengival pode estar relacionado com o metabolismo de colágeno tipo I. Em culturas de células, Johnson et al. (1986) descreveram que fibroblastos gengivais de FGH são capazes de sintetizar as mesmas quantidades de proteínas quando comparado a fibroblastos de GN, mas a produção de colágeno é apenas a metade nas células de FGH. Estes autores também descreveram que a proliferação celular é menor em fibroblastos de FGH. Shirasuna et al. (1989) demonstraram que apesar da capacidade de produzir elevados níveis protéicos incluindo colágeno, fibroblastos de FGH mostraram menor taxa de crescimento quando comparado com fibroblastos de GN. Desta forma, sugeriram que a hiperplasia gengival é resultado de

uma produção e acúmulo excessivos de colágeno tipo I no meio extracelular. Oikarinen et al. (1990) estudando um caso de FGH associado a deficiência na síntese de hormônios do crescimento, descreveram uma baixa taxa de proliferação celular, como descrito por Shirasuna et al. (1989), mas em contraste, o nível de produção de mRNA para colágeno tipos I e III foi menor nos fibroblastos de FGH. Sendo assim, estes autores sugeriram que o acúmulo de colágeno poderia ser decorrente de uma redução na atividade enzimática das collagenases, a principal enzima extracelular relacionada com a degradação de colágeno tipo I, ou poderia ser decorrente de um aumento nos níveis extracelulares de TIMPs, os principais inibidores extracelulares do catabolismo do colágeno. Embora sugerida como um dos possíveis fatores etiológicos da FGH, não existem dados na literatura que analisam a expressão e produção de enzimas do grupo das MMPS em indivíduos com FGH.

Tipton et al. (1997) estudando três casos de FGH demonstraram uma maior velocidade proliferativa e uma maior produção de colágeno tipo I e fibronectina por fibroblastos de FGH. Embora tenha sido descrito que a excessiva produção de TGF- β controla a síntese de colágeno e fibronectina em FGH, o mecanismo responsável pelo acúmulo de colágeno não está ainda entendido (Tipton and Dabbous, 1998). Segundo alguns autores, o tipo e a relação estequiométrica das moléculas de colágeno são os mesmos em gengiva normal, FGH e em hiperplasias gengivais induzidas por drogas. Eles relatam que a hiperplasia gengival não é decorrente da produção de um novo tipo e nem do acúmulo excessivo de um colágeno anormal (Becker et al., 1967; Johnson et al., 1986). Collan et al. (1982) descreveram através de microscopia eletrônica, que o colágeno na FGH é apenas mais maduro que o encontrado na gengiva normal. Estes autores também identificaram dois tipos distintos de fibroblastos: fino, associado às áreas ricas em MEC, mas pobre em fibras colágenas; e o grosso, aparentemente inativo, mas rico em fibras colágenas.

Tabela 1. Principais síndromes associadas a FGH.

Síndrome	Herança	Principais características além de FGH
Murray-Puretic-Drescher	Autossômica recessiva	• Múltiplos fibromas hialinos em cabeça e pescoço • Infecções recorrentes • Osteólise das falanges terminais
Rutherford	Autossômica dominante	• Retardo na erupção dental • Opacidade da córnea
Zimmermam-Laband	Autossômica dominante	• Displasia de nariz, orelha e unhas • Hipoplasia das falanges terminais • Hiperflexibilidade das articulações • Hepatoesplenomegalia
Jones	Autossômica recessiva	• Progressiva perda de audição
Cross	Autossômica recessiva	• Hipopigmentação dérmica • Microftalmia • Retardo mental
Cowden	Autossômica recessiva	• Fibradenoma gigante de mama • Hipertricose • Múltiplos hamartomas
Fibromatose Gengival	Autossômica dominante ou recessiva	• Hipertricose • Epilepsia • Retardo mental

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

4.2. PROTEÍNAS CHAPERONES E PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Proteínas desnaturadas podem espontaneamente voltar a apresentar o arranjo conformacional terciário ou quaternário *in vitro* com a simples substituição do tampão desnaturante. Por apresentar esta capacidade, foi sugerido que a sequência de aminoácidos de uma proteína contém todas as informações necessárias para a sua conformação nativa, não necessitando do auxílio de qualquer catalisador ou fonte de

energia. Embora este paradigma proposto por Anfinsen (1973) seja ainda parcialmente aceito, foi demonstrado que a conformação estrutural das proteínas, entre outros fatores, é dependente da ação de um grupo de proteínas catalisadoras denominadas proteínas *chaperones* ou proteínas que se ligam à cadeias peptídicas nascentes. Estas proteínas apresentam a capacidade de ligar a peptídeos em formação, tão logo inicia a síntese protéica propriamente dita com a deposição de aminoácidos nos ribossomos, sem reconhecer qualquer sequência específica, conferindo a proteína a conformação necessária para exercer sua função biológica. Foi demonstrado que as principais proteínas *chaperones* fazem parte da família de proteínas de choque térmico (HSPs).

Células *in vivo* e *in vitro* quando estimuladas por calor apresentam uma resposta fisiológica característica denominada de resposta a choque térmico. Esta resposta foi primeiramente descrita em 1962 por Ritossa, que observou alterações nos cromossomos de *Drosófilas* após estimulação térmica (Ritossa, 1962). Anos após esta constatação, Tissieres et al. (1974) demonstraram que as respostas celulares ao calor estão associadas com a ativação de uma família de genes e a síntese de um grupo específico de proteínas, que foram denominadas HSPs. A família de HSPs representa o principal mecanismo intrínseco celular de proteção a estímulos agressivos. Esta família é um dos mais conservados grupos através da evolução, sendo expresso por seres procariotos e eucariotos. A família de HSPs é formada por glicoproteínas com massa molecular variando entre 8 a 170 kDa, sendo que muitas apresentam níveis basais de expressão e funções essenciais em condições de homeostasia (Sens et al., 1997). Em condições normais e em resposta ao estresse, HSPs estão implicadas na interação proteína-proteína, como por exemplo na síntese e translocação de proteínas, na aquisição e estabilização da estrutura terciária, na prevenção de agregação e na secreção de proteínas (Ang et al., 1991). HSPs também são importantes na regulação de outras funções celulares como tradução de sinais (Ciocca et al., 1993), replicação do DNA (Echols, 1990), proliferação (Georgopoulos and Welch, 1993) e degradação de proteínas (Hayes and Dice, 1996). Diversos trabalhos demonstraram que HSPs em condições de estresse celular são capazes de atenuar e em muitas ocasiões, reverter o quadro de injúria celular. Os genes de choque térmico quando ativados apresentam a função de reprogramar muitas atividades celulares, tornando-a capaz de resistir ou reverter o quadro nocivo (Krone et al., 1997).

Recentes publicações demonstraram um possível papel de HSPs na eliminação de células neoplásicas. Estudos baseados na imunoterapia de ratos com

neoplasias malignas, como por exemplo melanoma e câncer de pulmão (neoplasias espontâneas), fibrossarcoma e carcinoma de cólon (neoplasias induzidas quimicamente) e carcinoma espinocelular de pele (neoplasia induzida por radiação actínica) tratados com preparações de HSPs (Hsp70, Hsp90 e Grp94) derivadas de tumores autólogos resultaram em um retardo na progressão da neoplasia, redução no número de metástases e prolongação da vida média do animal (Unodo et al., 1994; Tamura et al., 1997). Os mecanismos que cercam o papel de HSPs na terapia de neoplasias malignas são ainda desconhecidos. Contudo, foi demonstrado que linfócitos T CD8, CD4 e NK são importantes co-fatores e efetores desta função. Quando estas células foram depletadas previamente à imunização ou ao tratamento do animal, a eficiência dos complexos de HSPs na retenção da progressão do tumor foi menor e o animal morria com a metade do tempo de um animal com níveis normais de células T (Unodo et al., 1994).

A resposta ao choque térmico é imediata e complexa, ATP dependente, transiente, envolve ciclos de associação e dissociação de proteínas, sendo caracterizada por induzir aumento no nível de HSPs e bloquear a síntese de proteínas normais (Schlesinger, 1986; Langer et al., 1992). A resposta ao choque térmico não é induzida exclusivamente por estimulação térmica, outras formas de agressão celular, como produção de radicais livres, anóxia, isquemia, infecções virais, processos inflamatórios, presença de metais pesados, alterações no pH, inibidores de glicosilação, inibidores do metabolismo energético, tratamento com nucleotídeos análogos, e presença de substâncias químicas como etanol, nicotina, anestésico, brefeldina A e cálcio ionofore também são capazes de estimular a resposta ao choque térmico (Hightower, 1991). Em vista disto, foi sugerido um nome mais amplo para este grupo de proteínas, proteínas de resposta ao estresse. As proteínas até o momento descritas com ação de HSPs e *chaperone* estão descritas na tabela abaixo (Tabela 2). Hsp70, Hsp90 e Hsp47 são as principais famílias de proteínas de resposta ao estresse, consideradas importantes *chaperones*, e serão descritas individualmente.

Tabela 2. Principais HSPs que atuam como proteínas *chaperones* e respectivas funções.

Proteína	Função
Nucleoplasmina	Organização e desorganização de nucleossomos Organização de ribossomos e ribonucleoproteínas Transcrição
SecB	Transporte de peptídeos
PapD	Organização do pilus bacteriano
PrfM	Conformação de proteínas bacterianas
PrsA	Conformação de proteínas bacterianas
Lim	Conformação da lipase bacteriana
p22	Organização e desorganização da parede bacteriana
SRP	Transporte de peptídeos
Pro-sequences	Conformação de proteases
Rb	Ligação a fatores de transcrição
DnaJ/Hsp40 bacteriana	Interação com DnaK e GrpE em bactérias Interação com Hsp70 em leveduras
GrpE	Interação com DnaK em <i>E. coli</i>
GroES	Interação com GroEL em <i>E. coli</i>
Hsp47	Conformação e transporte de colágeno Degradação de proteínas no RE
GroEL/Hsp60 bacteriana	Conformação e transporte de proteínas
Hsp60	Conformação e transporte de peptídeos nas mitocôndrias
DnaK/Hsp70 bacteriana	Conformação e transporte de peptídeos em eucariotos e procariotos
Grp75	Conformação e transporte de peptídeos em mitocôndrias
Grp78/BIP	Conformação e transporte de peptídeos no RE degradação de proteínas no RE
Hsp90	Conformação e transporte de peptídeos
Grp94	Conformação e transporte de peptídeos no RE
Hsp104	Dissociação de agregados protéicos
Hsp10	Auxilia Hsp60 na conformação e transporte de peptídeos nas mitocôndrias

4.2.1. Síntese Protéica

Há vários estágios na síntese protéica desde a ativação do DNA até a proteína funcional. A célula eucariótica apresenta uma maquinaria bem desenvolvida capaz de controlar a síntese protéica nos seus vários estágios. Para muitos autores, a expressão gênica e a formação da molécula de mRNA são os eventos mais importantes e são os eventos que apresentam vários níveis de controle. São eles: controle transcricional, controle no processamento, transporte e degradação da molécula mRNA e controle traducional (Alberts et al., 1994). Os eventos pós-traducionais são os responsáveis pelo processamento, conformação, síntese e secreção, portanto, relacionados com a organização e função da proteína. Neste capítulo serão descritos os eventos pós-traducionais da síntese protéica, do transporte para o retículo endoplasmático (RE) à distribuição para a célula e/ou meio extracelular.

Em células eucarióticas o transporte de proteínas para o RE acontece antes que se complete a síntese da cadeia polipeptídica, isto é, ocorre em uma fase co-traducional. Esta característica distingue o processo de transporte de proteínas para outros compartimentos celulares como mitocôndrias, núcleo e peroxissomos, o qual acontece na fase pós-traducional e requer inúmeros sinais peptídicos. O RE é a organela responsável pela biossíntese de todas as proteínas destinadas a secreção e aos compartimentos celulares, onde incluem o próprio RE, aparelho de Golgi, lisossomos, endossomos, vesículas secretoras, peroxissomos, mitocôndrias e a membrana plasmática. O RE é também o locus de muitas modificações pós-traducionais incluindo a aquisição de estrutura terciária, formação de polímeros, formação de pontes de bissulfeto, hidroxilação do resíduo de lisina e prolina resultando na formação dos aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina e glicosilação (Alberts et al., 1994). Em procariotos, as proteínas destinadas a secreção são transferidas diretamente para a membrana plasmática.

O transporte para e através do RE envolve uma seqüência de eventos como o reconhecimento de precursores, ligação à membrana da organela, entrada no RE, ligação de proteínas *chaperones* e da proteína dissulfeto isomerase (PDI), sinal de clivagem e transporte para o complexo de Golgi. O peptídeo é transportado para a membrana do RE por uma partícula de reconhecimento de sinal (SRP), o qual cicla entre o RE e o citosol ligando a cadeias nascentes de proteínas, tão rápido quanto o peptídeo emerge dos ribossomos (Wolin, 1994). Após a ligação, o complexo é transportado a membrana do RE onde liga a um receptor específico denominado

receptor da partícula de reconhecimento de sinal (Nicchitta et al., 1991). Este receptor é uma proteína membrânica com regiões expostas ao citosol e ao lúmen do RE (Lingappa, 1991). Após ativação do receptor e hidrólise de moléculas de GTP como fonte de energia, abre um poro por onde a cadeia é introduzida no lúmen do RE (Gilmore, 1993). Os fenômenos que cercam esta reação ainda são poucos conhecidos. Uma vez no interior do RE, proteínas residentes do RE ligam as cadeias polipeptídicas conferindo a correta conformação estrutural da molécula. As principais proteínas residentes no RE são PDI e as proteínas *chaperones*.

PDI é a mais abundante proteína do lúmen do RE. Esta proteína catalisa a oxidação de grupos sulfidrilas livres (SH) formando pontes de dissulfeto (S-S) (Freedman, 1989). Quase todos os resíduos do amino-ácido cisteína das proteínas intra e extracelulares são oxidados formando pontes de dissulfeto. Recentes estudos demonstraram que PDI é uma molécula multifuncional e pode participar de muitos outros complexos eventos como hidroxilação de resíduos de prolina (foi demonstrado 100% de similaridade estrutural entre PDI e a subunidade b da enzima prolil-4-hidroxilase), componente periférico do sistema oligossacariltransferase envolvendo as cadeias nascentes de polipetídeos e pode participar na hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato formando dois subprodutos: 1,2-diacylglicerol e o inositol 1,4,5-trifosfato (Pihlajaniemi et al., 1987; Greetha-Habib et al., 1988).

O termo *chaperone* foi primeiramente usado por Laskey et al. (1978) para descrever a proteína nucleoplasmina, uma proteína nuclear com função de organizar o DNA e as histonas formando a estrutura de nucleossomos em *Xenopus*. Laskey et al. (1978) demonstraram que a adição de nucleoplasmina ao precipitado composto de DNA e histonas resulta no arranjo de nucleossomos. Eles também demonstraram que nucleoplasmina não interage com o DNA, mas interage com as histonas promovendo mudanças eletrostáticas que resultam na estruturação dos nucleossomos. O termo *chaperone* é então apropriado, pois a proteína interage com as histonas reduzindo a repulsão eletrostática entre elas, atuando na organização e não na estruturação dos nucleossomos. Atualmente proteínas *chaperones* são descritas como uma classe de proteínas capazes de associar e dissociar de forma transiente a porções hidrofóbicas das cadeias nascentes de polipeptídeos nos eventos de aquisição da estrutura terciária e polimerização. Os mecanismos de expressão e função destas proteínas em eucariotos são complexos. Alguns membros são apenas induzidos a expressão e função em condições de estresse celular, enquanto outros são sintetizados constitutivamente. As principais proteínas *chaperones* pertencentes ao grupo das HSPs serão descritas com maior detalhes a seguir.

O transporte das proteínas a partir do RE até o momento da secreção ou integralização com outra organela é realizado através de vesículas, que partem de um compartimento e se fundem a outros (Barlowe et al., 1994). A formação das vesículas é coordenado por complexos protéicos (complexo Sar1p, Sec23p e complexo Sec13p) que ligam as membranas estimulando a formação e liberação de vesículas (Pelhan, 1994). Existem três tipos de vesículas: clatrinadas, COPI e COPII. As clatrinadas foram identificadas mediando endocitose e transporte de proteínas da região *trans* do complexo de Golgi para os endossomos e membrana plasmática (Pearse and Robinson, 1990). O segundo tipo de vesícula foi identificada no aparelho de Golgi e em vesículas derivadas dele. Recentes estudos demonstraram que COPI e COPII são requeridas no transporte de proteínas do complexo de Golgi à superfície celular para posterior secreção (Rothman, 1994; Barlowe et al., 1994). Basicamente, COPI e COPII diferem na composição dos complexos e na mediação do transporte. Nos compartimentos do complexo de Golgi as proteínas em formação sofrem várias modificações estruturais, como glicosilação. Como descrito previamente, no RE muitas proteínas são glicosiladas, mas nesta etapa apenas uma espécie de açúcar é adicionada ao peptídeo, os açúcares N-ligados. No complexo de Golgi dependendo da proteína, ocorre modificações e/ou adição de novos açúcares. Ocorre a glicosilação dos açúcares O-ligados (Alberts et al., 1994).

Do complexo de Golgi, as proteínas podem seguir cinco vias: (i) retornar ao RE, funcionando como uma proteína residente do RE; (ii) ficar retida no complexo de Golgi como residente permanente; (iii) ser transportada para organelas celulares; (iiii) dirigir-se a membrana celular, funcionando como um componente estrutural e/ou funcional; ou (iiiii) ser secretada para o meio extracelular. As proteínas são secretadas por exocitose, ocorrendo fusão das vesículas com a membrana celular. Os principais produtos celulares secretados são os proteoglicanos e as glicoproteínas da MEC.

4.2.2. Regulação Gênica - Gene de Choque Térmico

Em condições patológicas a capacidade celular em resistir a múltiplas formas de agressão está relacionada com o aumento na expressão de HSPs. A expressão destas proteínas pode ser regulada em níveis transcricionais, processamento de RNA e níveis traducionais. HSPs são sintetizadas por uma família de genes dominada de genes de choque térmico. A transcrição destes genes é rapidamente induzida após

estímulos térmicos pelo fator de transcrição de choque térmico, o qual é capaz de ligar a uma conservada seqüência de DNA conhecida como elemento de choque térmico, presente nas regiões franqueadoras dos genes. Os elementos de choque térmico apresentam uma seqüência variável de cinco pares de base (nGAAn), onde os fatores de choque térmico são capazes de ligar e desencadear a síntese protéica (Perisic et al., 1989; Sorger, 1991). Todos os promotores dos diferentes genes de choque térmico, de diferentes espécies, apresentam as regiões de cinco pares de base. Contudo, a organização (seqüência correta ou inversa) e o número de repetições são variáveis. Por exemplo, em *Drosófilas*, a região promotora do gene Hsp70 apresenta quatro seqüências de cinco pares de base, enquanto Hsp83 apresenta uma simples seqüência (Xiao and Lis, 1988; Amin et al., 1988). O significado biológico desta variação no número e na organização das repetições de cinco pares de bases é ainda desconhecido.

O isolamento e seqüenciamento do gene do fator de choque térmico foi primeiramente observado em *S. cerevisiae*, posteriormente este fator foi isolado de *Drosófilas*, células vegetais, galinha, camundongo e humanos (Nakai and Morimoto, 1993; Schuetz et al., 1991; Murphy et al., 1994). Apesar da grande conservação filogenética na seqüência dos elementos de choque térmico, o seqüenciamento das proteínas com função de fatores de choque térmico demonstrou algumas diferenças estruturais, mas todos os fatores até o momento identificados e seqüenciados mostraram similaridade ao domínio de ligação aos elementos e a região responsável pela associação dos monômeros (Schuetz et al., 1991). Em células humanas foi demonstrado a existência de quatro distintos fatores de choque térmico, mas a função exata de cada uma destas proteínas é incerta. A co-expressão de múltiplas formas de fatores de choque térmico sugere um papel específico para cada fator mediante diferentes formas de agressão. Na verdade foi demonstrado que os fatores de choque térmico-1, -3 e -4 correspondem realmente a fatores de resposta ao estresse, enquanto que o fator-2 não. O fator de choque térmico-2 está associado as fases iniciais da embriogênese, espermatogênese e na diferenciação de eritrócitos (Sistonen et al., 1994; Mezger et al., 1994).

Apesar do conhecimento dos fatores e dos elementos de choque térmico, ainda são incertos os conhecimentos sobre a regulação da expressão das HSPs em condições fisiológicas e de estresse celular. Em *Drosófilas* e em células humanas, a capacidade de trimerização dos fatores de choque térmico e a ativação da transcrição gênica ocorre apenas após condições de estresse celular. Contudo, em *S. cerevisiae*, o fator de choque térmico é capaz de ativar a transcrição em condições

fisiológicas. Isto sugere que em células humanas a ativação do fator envolve duas etapas distintas. Primeiro ocorre a indução da oligomerização dos monômeros e, em seguida, fosforilação dos resíduos de serina dos fatores de choque térmico, criando um complexo com alta atividade transcricional (Sorger, 1990). Em *S. cerevisiae*, a indução do fator envolve apenas a segunda etapa. A seguir é apresentado o esquema proposto por Sorger (1991) sumarizando a ativação dos fatores de choque térmico e a transcrição dos genes de choque térmico.

Os fatores de transcrição são encontrados na célula como monômeros inativos, que adquirem a capacidade de ligar e ativar o DNA quando induzidos por estresse celular a formar trimeros. Formas monoméricas de fatores de choque térmico de *Drosófilas* em ensaios utilizando proteínas truncadas incapazes de associarem entre si, mostraram menor eficiência na ligação ao DNA que formas triméricas (Soger, 1991). Nesta observação foi baseada a primeira etapa da hipótese de ativação. Hensold et al. (1990) demonstraram diferenças no fator de choque térmico de *S. cerevisiae* e em outros organismos antes e após estímulos térmicos. Basicamente, as diferenças foram as regiões de fosforilação e a capacidade de indução da transcrição. Estas observações demonstraram que a fosforilação está diretamente envolvida na capacidade de fatores de choque térmico estimular a transcrição gênica (segunda etapa da hipótese). A expressão de HSPs em condições de homeostasia celular parece não estar relacionada com a participação dos fatores de choque térmico.

4.2.3. Família Hsp90

Membros da família Hsp90 clonados e seqüenciados mostraram ser os mais conservados entre todas as famílias de proteínas de estresse (Mazzarella and Green, 1987). Diversos estudos demonstraram que as proteínas da família Hsp90 são as mais abundantes proteínas do estresse de eucariotos (Jakob and Burchner, 1994).

A diversificação dos genes da família Hsp90 em eucariotos produz duas proteínas, a primeira localizada no citosol celular e a outra associada ao RE. A proteína citosólica, Hsp90, é menor que a proteína do RE e funciona como uma proteína *chaperone* em condições fisiológicas (Freeman and Morimoto, 1996) e em condições de estresse celular (Jakob et al., 1995). Hsp90 está associada a diversas proteínas celulares, como receptores de estrogênio, progesterona, glicocorticóides e mineralocorticóides (Caplan et al., 1994). Sanchez et al. (1986) demonstraram que Hsp90 liga aos receptores de hormônios mantendo-os na forma inativa. Por exemplo,

o receptor de glicocorticóides na forma inativa está associado a duas moléculas de Hsp90 e a outras duas proteínas, sendo uma componente da família de HSP, Hsp53 (imunofilina), e a segunda, uma proteína citosólica denominada p23. A associação receptor-proteína ligante faz com que Hsp90 desligue, permitindo a ligação específica ao DNA e a modulação da transcrição gênica. Após a transcrição, o complexo volta a associar ao receptor, tornando-o inativo novamente. Picard et al. (1988) demonstraram que a inativação do receptor é resultado da desnaturação promovida por Hsp90. Yamamoto et al. (1994) demonstraram que a dissociação de Hsp90 do receptor e a posterior associação é mediada por Hsp70. Adicionalmente demonstraram que estas etapas de associação e dissociação são dependentes de energia proveniente da quebra de moléculas de ATP. Além de receptores hormonais, Hsp90 também associa a outras proteínas celulares incluindo quinases, caseína quinase II, INF-IIa quinase, pp60V-SRC e proteínas do citoesqueleto celular como actina e tubulina (Miyata and Yahara, 1991; 1992; Caplan et al., 1994). Hsp90 atua *in vitro* como uma proteína *chaperone* prevenindo a formação de agregados de proteínas desnaturadas (Freeman and Morimoto, 1996). Entretanto, a função principal *in vitro* parece ser na maturação de proteínas que participam da regulação gênica e dos sinais de transcrição (Rutherford and Zurker, 1994).

A proteína associada ao RE apresenta uma massa molecular maior que a proteína citosólica. Em análise por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dedecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), a proteína citosólica migra com uma massa molecular entre 87 e 92 kDa e a proteína associada ao RE, 94 a 108 kDa. Esta diferença no peso molecular é devido a uma região adicional de 24 aminoácidos ligada a porção C-terminal da proteína associada ao RE (Sorger and Pelhan, 1987). Grp94 também apresenta na porção C-terminal a sequência Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL), a qual opera como sinal de retenção no RE (Munro and Pelhan, 1986). A proteína associada ao RE é induzida em condições de privação de glicose, devido a este fato, tem sido designado a esta proteína o nome de proteína regulada por glicose. Grp94 também é denominada endoplasmína (Koch et al., 1986), Erp99 (Mazzarella and Green, 1987) e Gp96 (Maki et al., 1990). Grp94 é expressa constitutivamente em condições normais de crescimento, mas pode ser induzida por inibidores de glicosilação, cálcio ionofore e drogas que utilizam de nucleotídeos análogos, mas não é significativamente induzida por estímulos térmicos (Schleisinger, 1986). Grp94 é a principal proteína associada ao RE ligadora de cálcio e ATP (Clairmont et al., 1992), mas é independente de ATP para a sua função (Wiech et al., 1992).

A exata função de Grp94 continua incerta. Foi proposto que esta proteína facilita a conformação e transporte de polipeptídeos do RE ao aparelho de Golgi e evita a secreção de proteínas malformadas (Edington, 1992). Estudos *in vitro* utilizando a proteína purificada de pâncreas bovino e proteínas desnaturadas demonstraram que após a substituição da solução desnaturante, Grp94 é a primeira proteína *chaperone* a associar as proteínas desnaturadas facilitando a reconstituição estrutural e função (Jakob et al., 1995). Parsell et al. (1994) demonstraram que a concentração de Grp94 em temperaturas elevadas é maior que em condições normais, sugerindo um papel na proteção e restauração de proteínas desnaturadas. A síntese de Grp94 é também estimulada em situações de aumento da demanda funcional, i.e., em condições de aumento na síntese protéica (Dorner et al., 1989). A associação de Grp94 na maturação e transporte de cadeias nascentes de colágeno tipo I e IV foi proposta em diversos trabalhos (Sauk et al., 1994; Ferreira et al., 1994; Smith et al., 1995; Ferreira et al., 1996). Estes trabalhos sugeriram que Grp94 é constitutivamente expressa na célula e que heterocomplexos, associação de Grp94, Grp78 e Hsp47, são formados durante a síntese de colágenos tipo I e IV. Segundo Melnick et al. (1992), o complexo Grp94/Grp78 em células B é responsável pela maturação das cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas e pela eliminação de excessos de subunidades. Adicionalmente, também demonstraram que esta associação é transiente, ATP-dependente e envolve ciclos de associação e dissociação.

4.2.4. Família Hsp70

Membros da família Hsp70 foram primeiro identificados em *Drosófilas*, e posteriormente em *E. coli*, leveduras e humanos. Estas proteínas estão localizadas nos diferentes compartimentos celulares onde a maturação de proteínas, aquisição de estrutura terciária e polimerização de subunidades podem ser estabelecidas ou alteradas, como por exemplo nas mitocôndrias, RE e citosol celular. Células eucarióticas apresentam diversas seqüências gênicas para a família Hsp70. Por exemplo, *Drosófilas* apresentam oito genes, humanos apresentam no mínimo 10 genes e, o eucarioto simples *S. cerevisiae* contém 8 genes para Hsp70 (Werner-Washburne et al., 1987). A família Hsp70 em humanos é formada por no mínimo 4 membros, com estruturas muito similares, sendo que três membros desta família (Hsc73, Grp78 e Grp75) são expressos de forma constitutiva enquanto que Hsp70 é expressa apenas em condições de estresse celular. Estas proteínas têm recebido

várias designações, sendo a nomenclatura proposta por Watowich e Morimoto (1988) a mais usada: Hsp70 (também conhecida por Hsp72, 73K, Hsc70, SP71, Hsp68); Hsc73 (p72, 73K, Hsc70, Hsp73); Grp78 (BIP, Hsp80) e Grp75 (mHsp70, mtHsp70). Hsc73, Hsp70 e Grp78 são as mais estudadas e caracterizadas proteínas da família Hsp70.

Hsp70s apresentam funções essenciais no metabolismo de proteínas em condições de estresse e homeostasia celular. Dentre as principais funções podemos listar: manutenção de peptídeos nascentes no estado de estrutura primária (Zimmerman et al., 1988; Phillips and Silhavy, 1990), dissociação de agregados protéicos e participação na renaturação de proteínas (Skowrya et al., 1990; Gaitanaris et al., 1990), associação a outras proteínas *chaperones* na maturação de peptídeos (Beckmann et al., 1990) e auxílio na distribuição de proteínas para as mitocôndrias (Sheffield et al., 1990), RE (Chirico et al., 1988), núcleo (Shi and Thomas, 1992) e peroxissomos (Walton et al., 1994). Esta versatilidade de funções da família Hsp70 parece ser resultado da capacidade de reconhecer os segmentos hidrofóbicos de proteínas em formação na presença de ATP. Em leveduras, Schlenstedt et al. (1995) demonstraram que as funções celulares de Hsp70 são sempre realizadas em associação com Hsp40. A relação entre estas duas proteínas é baseada na habilidade de Hsp40 interagir e estimular a atividade de ATPase de Hsp70 (Cheetham et al., 1994). Estes autores demonstraram que o sistema Hsp70/Hsp40 apresenta funções celulares apenas em condições de estresse celular. Em humanos ainda não foi demonstrado esta associação.

Hsc73 é expressa de forma constitutiva no núcleo e citoplasma celular onde atua regulando o ciclo celular (Millaski and Morimoto, 1986), estimulando o sistema de degradação lisossomal (Agarraberes et al., 1997) e organizando o citoesqueleto citoplasmático (Geen and Liem, 1989). Hsc73 foi também identificada em nucléolos mas apenas em condições de estresse celular (Welch and Feramisco, 1985). Recentes estudos demonstraram que Hsc73 é requerida na polimerização de diversas proteínas celulares como receptores de esteróides (Hutchison et al., 1994) e na conformação e desorganização de vesículas de clatrina (DeLuca et al., 1990). Quando culturas celulares são privadas de soro, ocorre uma intensificação dos fenômenos de proteólise intracelular (Hendil et al., 1990). Este aumento na degradação parece estar associado a um aumento na expressão de Hsc73, que atua estimulando o sistema de degradação lisossomal. Segundo estudos de Hayes and Dice (1996), Hsc73 liga a proteína a ser degradada, transportando-a aos lisossomos. No lisossomo, Hsc73 associa a um receptor transmembrânico denominado Igp96 que

permite a entrada da proteína. Após a entrada, a proteína associa a Hsc73 lisossomal (ly-Hsc73; proteína de choque térmico cognata intralisossomal), que apresenta a proteína as endonucleases, sendo desta forma degradada.

Hsp70, a forma induzida da família, é expressa no citoplasma, núcleo e nucléolos de células eucarióticas apenas em condições de estresse celular (Brown et al., 1993). Hsp70 apresenta grande homologia estrutural com Hsc73, aproximadamente 90% da sequência de aminoácidos são idênticas, e ambas são purificadas em associação (Welch and Feramisco, 1985). Grp75 é uma proteína regulada por glicose, estando associada a matriz de mitocôndrias e cloroplastos (Mizzen et al., 1989).

Grp78 localiza exclusivamente no lúmen do RE de células secretoras (Munro and Pelham, 1986). A expressão desta proteína é aumentada em condições de privação de glicose, ação de inibidores de glicosilação e na presença de cálcio ionofore. Grp78 como outras proteínas residentes do RE, participa do processo de estruturação de proteínas recém-formadas (Melnick et al., 1992). Outra importante função de Grp78 é na identificação, retenção e degradação de proteínas mutantes. Cadeias nascentes de proteínas usualmente adquirem a conformação estrutural no RE, sendo assim secretadas, enquanto que proteínas mutantes ou com estrutura incorreta são bloqueadas neste ponto da síntese. Chessler and Byers (1993) estudando 20 diferentes casos de osteogênese imperfeita, uma doença causada pela mutação no gene da cadeia $\alpha 1$ do colágeno tipo I, encontrou que três apresentavam níveis elevados de Grp78. Nos três casos, a mutação resultava em cadeias $\alpha 1$ incapazes de associarem entre si e com a cadeia $\alpha 2$, portanto incapazes de serem sintetizadas. Hsp47 também é encontrada em níveis elevados, quando comparada com células normais, em fibroblastos de pacientes com osteogênese imperfeita (Kojima et al., 1997). Forsayeth et al. (1992) demonstraram a associação de Grp78 na degradação de proteínas malformadas do receptor de acetilcolina. Grp78 como outras proteínas residentes do RE apresenta na porção C-terminal o sinal de retenção KDEL (Pelham, 1989). Apesar da presença deste sinal, foi demonstrado que Grp78 pode ser exportada do RE (Takemoto et al., 1992).

Nos últimos anos, inúmeros estudos têm providenciado fortes evidências da existência de um sistema proteolítico associado ao RE, que funciona independente e com a mesma qualidade do sistema lisossomal, onde Grp78 é o principal componente (Klausner and Sitia, 1990; Davis and Mechan, 1996). Apesar de ainda não bem caracterizado, este sistema parece ser responsável pela degradação de proteínas desnaturadas e malformadas tão bem quanto do excesso de subunidades de

proteínas oligoméricas (Klausner et al., 1990). Em adição a estas condições descritas acima, proteínas normais parecem também ser degradadas no RE, indicando que este sistema pode ter um papel importante na regulação da síntese protéica (Dixon et al., 1991). Gil et al. (1985) demonstraram que em condições de níveis elevados de colesterol, HMG-coa redutase, uma enzima relacionada com a biossíntese de colesterol, é rapidamente degradada; e em níveis reduzidos de colesterol, os níveis de HMG-coa são aumentados. Estes autores demonstraram que este feedback positivo é controlado pela expressão de Grp78.

O melhor exemplo para demonstrar a existência deste sistema proteolítico associado ao RE é providenciado pelo receptor de antígenos de células T (Lippincott-Schwartz et al., 1988). O receptor de antígeno maduro é encontrado na superfície celular de células T e é composto por sete subunidades transmembrânicas. Complexos parciais ou subunidades isoladas não são expressos na superfície celular, e em geral, são degradados por Grp78 no RE de células T, tão bem quanto em fibroblastos transfectados com os genes das subunidades do receptor (Klausner and Sitia, 1990). Na verdade, os eventos do sistema proteolítico associado ao RE apresentam até o momento mais questões que respostas. Faltam informações sobre os mecanismos utilizados para o reconhecimento, retenção, degradação e escolha desta via de degradação.

4.2.5. Hsp47

Hsp47, também denominada coligina, foi primeiramente descrita por Kurkinen et al. (1984) como uma glicoproteína citoplasmática capaz de ligar a gelatina. Posteriormente, foi demonstrado que Hsp47 não é secretada no meio de cultura e está associada ao RE (Saga et al., 1987), além de ser caracterizada por associar especificamente e exclusivamente com cadeias nascentes de colágeno tipos I, II, III, IV e V (Sauk et al., 1994; Satoh et al., 1996). Em condições fisiológicas sugere que esta proteína seja responsável pelo processamento e maturação de moléculas de colágeno, prevenindo a formação e secreção de proteínas mutantes ou malformadas (Nagata et al., 1996).

A expressão de Hsp47 foi detectada exclusivamente em células produtoras de colágeno. Por exemplo, foi detectada imunohistoquimicamente em fibroblastos e células musculares lisas mas não em hepatócitos (Saga et al., 1987). Em culturas celulares, linhagens de fibroblastos BALB/3T3 expressam Hsp47, enquanto outras linhagens como células neuronais (PC12) e células leucêmicas (M1) não apresentam

esta proteína (Nakai et al., 1992). A clonagem e o seqüenciamento de Hsp47 em humanos, camundongos e galinhas demonstraram uma seqüência sinal na porção N-terminal e um sinal de retenção no RE, RDEL (Arg-Asp-Glu-Leu), na porção C-terminal. A presença destes sinais confirmam que Hsp47 é uma proteína residente do RE (Takechi et al., 1992). Contudo, recentemente foi demonstrado que, em condições de estresse celular como redução do pH, Hsp47 é expressa em associação com o receptor para a seqüência KDEL na superfície celular (Sauk et al., 1998). Uma possível função para esta expressão é ainda desconhecida.

A clonagem, seqüenciamento e descrição estrutural do gene humano que codifica a proteína Hsp47, denominado CBP2, foi recentemente reportada por Ikegawa e Nakamura, 1997. Anteriormente, apenas em camundongos e galinhas o gene tinha sido clonado (Hosokawa et al, 1993). Como observado para outras HSPs, o gene das três diferentes espécies mostraram grande homologia. O gene CBP2 clonado por Ikegawa e Nakamura (1997) tem aproximadamente 11 Kpb consistindo de 5 exons (I-V) separados por íntrons de A a D. O tamanho dos exons são 53 (exon I), 656 (exon II), 99 (exon III), 234 (exon IV) e 1005 (exon V) bp. Os íntrons apresentam aproximadamente 4,0; 2,0; 0,1 e 2,5 Kbp de A a D, respectivamente. O promotor é formado por uma região TATAbox posicionada -45 pb, quatro regiões de ligação Sp-1 e um sítio de ligação Ap-1, mas regiões CAAT box não foram encontradas. A região promotora também apresenta uma complexa seqüência de elementos de choque térmico (três repetições de nGAAn ou nTTCn) entre as regiões -78 e -91 bp da região franqueadora. O promotor do gene Hsp47 não mostrou nenhuma homologia com qualquer região promotora de vertebrados até o momento descrita. CBP2 foi mapeado para o cromossomo 11q13.5 (Ikegawa et al; 1995).

As interações de Hsp47 com moléculas de colágeno foram amplamente examinadas *in vitro* e *in vivo*. As constantes de dissociação e as relações de associação foram determinadas utilizando colágeno dos tipos I-V e recombinantes de Hsp47 de camundongos (Natsume et al., 1994). As constantes de dissociação de Hsp47 com colágenos tipos I-V variam entre 10^{-6} - 10^{-7} M, o qual é relativamente alta para interações entre moléculas. Possivelmente esta baixa afinidade a pró-colágeno seja necessária para uma rápida associação e dissociação durante os processos de formação e transporte da molécula para o complexo de Golgi. Por outro lado, a relação de associação é alta ($K_a \sim 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$). Análises *in vivo* através de técnicas de imunoprecipitação utilizando anticorpos anti-Hsp47 e anti-colágenos, e de técnicas de cinética de associação demonstraram que Hsp47 liga de forma transiente a cadeias nascentes de colágeno (Sauk et al., 1994). Outras *chaperones*

como Grp78, Grp94 e PDI também coprecipitam e colocalizam com Hsp47 e colágeno, mostrando estarem associadas a este complexo (Ferreira et al., 1994). Esta associação também foi confirmada por ensaios de imunofluorescência e microscopia eletrônica (Saga et al., 1987; Nakai et al., 1990). Fibronectina foi também demonstrada associar com Hsp47. Contudo, Hsp47 não associa, *in vitro*, com fibronectina plasmática (Nakai et al., 1989; 1992). Uma possível explicação para esta associação, é uma associação indireta de fibronectina com Hsp47 via moléculas de colágeno.

O colágeno tipo I é formado por duas cadeias $\alpha 1(I)$ e uma cadeia $\alpha 2(I)$, o qual apresenta três distintos domínios: região N-terminal, domínio central composto por repetições Gly-X-Y e porção C-terminal. Recentes estudos sugeriram que Hsp47 interage especificamente e exclusivamente com o domínio globular da porção N-terminal das cadeias $\alpha 1(I)$, mas não interage com cadeias $\alpha 2(I)$ (Sauk et al., 1990a; 1990b; Hu et al., 1995). A ligação Hsp47-pró-colágeno é resistente a presença de solução aquosa de 2 M NaCl, mas é completamente quebrada *in vitro* quando o pH do tampão é alterado para níveis inferiores a 6.3 (Saga et al., 1987). Esta acidificação provavelmente seja o mecanismo de dissociação de Hsp47 e moléculas de pró-colágeno em condições de homeostasia, importante para o transporte da molécula para o aparelho de Golgi. Segundo Satoh et al. (1996), Hsp47 liga as cadeias nascentes de pró-colágeno tão rápido quanto inicia o processamento nos ribossomos, e esta associação permanece atravessando a membrana do RE e atingindo o complexo de Golgi. Se o transporte de proteínas do RE para o aparelho de Golgi é inibido por brefeldina A ou por baixas temperaturas, pró-colágeno não dissocia de Hsp47 e ambos permanecem nos compartimentos *cis* do aparelho de Golgi, como revelado por microscopia confocal. Por outro lado, quando as células são tratadas com monensina ou bafiomicina A1 (o qual bloqueiam a secreção de proteínas na porção pós-*cis* e pós-*trans* do aparelho de Golgi, respectivamente), o acúmulo de pró-colágeno é observado em compartimentos distintos ao de Hsp47 (Satoh et al., 1996). Estes resultados demonstraram que a dissociação Hsp47-pró-colágeno provavelmente ocorre nos compartimentos *cis* do aparelho de Golgi. Shroff et al. (1993) demonstraram a presença de Hsp47 nos compartimentos intermediários entre o RE e o complexo de Golgi. É proposto que após a dissociação da molécula de tropocolágeno via provavelmente acidificação do pH, Hsp47 recicla para o RE por um processo envolvendo a sequência KDEL e receptores erd2P (Nagata, 1996).

Existem vários estudos na literatura demonstrando que a expressão de Hsp47 é regulada pela produção de colágeno. Tabela 3 mostra as principais células

produtoras de Hsp47 e a relação de expressão com colágeno. A síntese de colágeno tipo I, o principal colágeno secretado por fibroblastos, diminui após transformação maligna destas células. Quando fibroblastos de galinha são induzidos a transformação pelo vírus do sarcoma de Rous (RSV; Nagata and Yamada, 1986) ou fibroblastos BALB/3T3 são transformados pelo vírus simian 40 (SV40), Nakai et al. (1990), a expressão de Hsp47 por estas células também diminui. Por outro lado, os níveis de Hsp47 são significativamente induzidos durante a diferenciação de células F9 (Takechi et al. 1992; Ferreira et al. 1996). Células primitivas F9 são induzidas a diferenciar em células viscerais na presença de ácido retinóico ou pela combinação de ácido retinóico e dibutíridil AMPcíclico. Quando diferenciadas, estas células são capazes de produzir grandes quantidades de colágeno tipo IV (Strickland et al. 1978). Interessantemente, células indiferenciadas mostraram pouca expressão de Hsp47, mas quando diferenciadas, a produção de Hsp47 foi significativamente aumentada. Clarke et al. (1993) e Yamamura et al. (1998) demonstraram a indução de Hsp47 como consequência do aumento na expressão de colágeno após tratamento de linhagens celulares de mioblastos e osteoblastos com TGF- β . Recentes publicações demonstraram a expressão aumentada de Hsp47 em paralelo a progressão de doenças fibróticas. Massuda et al. (1994) demonstraram em condições patofisiológicas, indução de fibrose hepática pela administração oral de tetracloreto de carbono, altos níveis celulares de Hsp47 mRNA, enquanto que em condições normais Hsp47 não foi expressa. Razzaque et al. (1998a) demonstraram aumento na expressão de Hsp47 durante a fibrose pulmonar de ratos induzidos por bleomicina. Adicionalmente, estes autores também demonstraram, através de ensaios imunohistoquímicos, a colocalização de Hsp47 e colágeno tipo I. A expressão de Hsp47 foi observada ser estimulada em diversos modelos experimentais de indução de fibrose renal (Razzaque and Taguehi, 1997; Cheng et al., 1998; Sunamoto et al., 1998a; Moriyama et al., 1998; Razzaque et al., 1998b; Razzaque et al., 1998c). O aumento na expressão de Hsp47 em culturas primárias de fibroblastos provenientes de pacientes com esclerose sistêmica de pele, é acompanhada por um aumento nos níveis de expressão de colágeno (Kuroda et al., 1998). Estes autores também descreveram que as adições ao meio de cultura de TGF- β 1 e IL-4 aumentam a expressão de Hsp47. A co-expressão de Hsp47 e colágeno foi demonstrada durante o desenvolvimento de molares de rato, onde odontoblastos e células do folículo dental produzem grandes quantidades de colágeno (Shroff et al., 1994a; 1994b) e em vários tecidos embrionários de galinha (Miyaishi et al., 1992). As alterações na expressão de Hsp47 relatadas nestes vários estudos são consistentes com as

mudanças nos níveis de produção de moléculas de colágeno, possibilitando concluir que a expressão de Hsp47 é diretamente regulada por colágeno.

A exceção à esta regra ocorre quando Hsp47 é induzida por estímulos térmicos ou outras formas de estresse celular. Após condições de estresse, os níveis de Hsp47 são rapidamente elevados, enquanto os de colágeno permanecem inalterados. Isto sugere que nestas condições, a indução de Hsp47 ocorre via sistema elemento-fator de choque térmico, contudo outras vias de indução não podem ser excluídas. Um candidato para tal regulação é a família de fatores de transcrição GATA, o qual foi relatada ser funcional durante a diferenciação de células F9 (Wang, 1994). O gene de Hsp47 na região promotora apresenta um sítio de ligação para estes fatores (Bielinska and Wilson, 1995).

Outro interessante aspecto na expressão de Hsp47 é o *splicing* alternativo. cDNAs isolados de clones de células F9 antes e após a diferenciação, denominados MH47b e MH47c, e MH47a clonado de uma biblioteca de cDNAs de fibroblastos estimulados por choque térmico, são idênticos exceto por uma região não transcrita na porção 5' de MH47a. Em condições fisiológicas, MH47b é o transcrito mais abundante e MH47c é apenas detectado em pequenas condições, enquanto que MH47a não é detectado. Contudo, em condições de estímulos térmicos, MH47a apresenta níveis tão elevados quanto os de MH47b. MH47a também é induzido por outras formas de estresse celular (Wang and Gudas, 1990; Takechi et al., 1994). Estes resultados sugerem que a expressão de Hsp47 pode ser regulada a níveis transcricionais, e não apenas a níveis traducionais como descrito anteriormente.

As funções de Hsp47 em condições de estresse celular ainda não são bem conhecidas. Alguns autores especulam que em condições de estresse celular, Hsp47 poderia apresentar duas funções principais: (i) ligar a moléculas de colágeno prevenindo a desnaturação e degradação e/ou (ii) auxiliar Grp78 no sistema de digestão do RE, degradando moléculas de colágeno desnaturada. Quando células em cultura são induzidas ao estresse com α, α' -dipiridil, um quelante de íons e inibidor das enzimas prolil e lisil-hidroxilase, moléculas de pró-colágeno não formam tripla hélices estáveis e não são secretadas. Nakai et al. (1992) trataram culturas celulares de fibroblastos com α, α' -dipiridil por diversos períodos de tempo e demonstraram um aumento na síntese de Hsp47 em resposta ao acúmulo intracelular de pró-colágeno malformado. Adicionalmente, encontraram elevados níveis de expressão de Grp78, possivelmente atuando em associação com Hsp47 na degradação destas proteínas. Kudo et al. (1994) demonstraram níveis aumentados de Hsp47 em fibroblastos estimulados por choques térmicos. Jain et al. (1994) encontraram resultados

semelhantes ao de Kudo et al., sugerindo que a expressão alterada de Hsp47 preveniria a degradação de pró-colágeno no RE. Vários estudos utilizando diferentes formas de alteração na composição do colágeno, como por exemplo substâncias químicas, hipertermia e terapia fotodinâmica, também sugeriram a participação de Hsp47 na preservação de moléculas intactas e na degradação de moléculas desnaturadas (Verrico and Moore, 1997).

Hsp47 apresenta características distintas de outras proteínas *chaperones* como a não afinidade à moléculas de ATP, dissociação das moléculas de colágeno na presença de soluções ácidas, ponto isoelétrico incomum (pI=9,0) e ligação a gelatina (Kurkinen et al., 1984; Nakai et al., 1989). Outra característica importante que distingue Hsp47 de outras proteínas *chaperones*, é a especificidade a um substrato. Enquanto Hsp47 liga especificamente a moléculas de colágeno, outras *chaperones* não apresentam qualquer afinidade a um substrato. Além de ser uma proteína altamente glicosilada, onde a porção oligossacarídica constitui cerca de 10 a 15% de seu peso molecular. Hsp47 possui uma das mais ricas estruturas polissacarídicas, rica em unidades de manose, encontrada dentre as proteínas de choque térmico já estudadas (Hughes et al., 1987).

Hsp47 foi a primeira proteína residente no RE descrita com função de inibidor de serina proteases (Clarke et al., 1993). A família de inibidores de serina proteases é composta por no mínimo 40 membros. Hsp47 apresenta alta similaridade estrutural com dois membros desta família, inibidor de α 1-protease e inibidor do fator de ativação de plasminogênio, similaridade de 27,2% e 26,1% respectivamente (Takechi et al., 1992). Recentemente, outras duas proteínas similares a Hsp47 foram descritas. A primeira, isolada a partir de uma biblioteca de cDNA de células F9 (Wang and Gudas, 1990). A outra glicoproteína, gp46, foi isolada de mioblastos de ratos (Clarke et al., 1991). Estas três proteínas, incluindo Hsp47, são consideradas ser a mesma proteína.

Em células normais, Hsp47 está localizada exclusivamente no RE onde está associada a maturação e transporte de pró-colágeno. Contudo, foi recentemente demonstrado que Hsp47 é expressa na superfície celular de tumores bem diferenciados (Morino et al., 1997). Recentemente nós demonstramos que Hsp47 é ancorada na superfície celular de linhagens celulares provenientes de carcinomas espinocelulares de boca em associação com CD9 (Hebert et al., 1999). Este complexo modula a motilidade e invasão celular, possivelmente agindo como um receptor de colágeno. O exato mecanismo para tal expressão de Hsp47 na superfície celular de células malignas é ainda incerto, mas propicia boas perspectivas para um

novo protocolo na terapia deste tipo de neoplasia, visto que a expressão de Hsp47 na superfície celular é encontrada exclusivamente em células malignas.

Tabela 3. Correlação entre expressão de Hsp47 e colágeno em diferentes tipos celulares.

Célula/Tecido	Linhagem celular	Hsp47	Colágeno (tipo)			
			I	II	III	IV
Fibroblasto	• CEF	+++	+++			
	• CEF transformado por RSV	+	+			
	• BALB/3T3	+++	+++			
	• 3T3 transformado por SV40	+	+			
	• NIH3T3	++	++			
	• 3T3 transformado por c-Ha-Ras	+	+			
	• 3T6	+++	+++			
Adipócito	• 3T3-L1	+++	+++			+
	• 3T3-L1 diferenciada	++	++			+
Células leucêmicas	• M1	-	-	-	-	-
Neurônio	• PC12	-	-	-	-	-
Carcinomas embrionários	• F9	±				±
	• F9 diferenciada	+++				+++
Fígado	• Hepatócito	-	-	-	-	-
	• Células de Ito	++			++	
	• Fibroblastos durante cirrose hepática	+++	+++		+++	
Osso	• Osteoblastos	+++	+++			
Cartilagem	• Condroblastos	+++		+++		
Dente	• Odontoblastos	++	++			

Legenda. ±: produção discreta, +: produção pequena, ++: produção moderada e +++: grande produção. Modificado do manuscrito Nagata, 1996

4.3. Colágeno

Colágeno é o protótipo de uma família de proteínas fibrosas encontrado em todos os animais multicelulares (Alberts et al., 1994). As moléculas de colágeno são secretadas principalmente por células presentes no tecido conjuntivo, e em mamíferos representam a mais abundante proteína estrutural (cerca de 25% do total de proteínas do organismo) (Bugeson, 1988). Vinte tipos distintos de moléculas de colágeno já foram descritos. As moléculas dos diferentes tipos de colágeno são formadas por combinações de vinte e cinco diferentes tipos de cadeias α , cada qual codificada por um gene distinto. A família colágeno pode ser dividida grosseiramente em 2 grupos: moléculas fibrilares e não-fibrilares. No primeiro grupo encontram os colágenos tipos I, II, III, V e XI. As moléculas mais estudadas são os colágenos fibrilares do tipo I, II e III, e o colágeno tipo IV, o principal componente da membrana basal (Timpl, 1989).

O colágeno tipo I é o mais abundante tipo encontrado no tecido conjuntivo (Flug and Köpf-Maier, 1995). Este tipo é produzido principalmente por células produtoras de matriz orgânica como fibroblastos, osteoblastos, odontoblastos e condroblastos. A molécula de colágeno tipo I é um heterotrímero formada por duas cadeias $\alpha 1(I)$ e uma cadeia $\alpha 2(I)$ dispostas em forma de tripla hélice com aproximadamente 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro (Martin et al., 1985). Cada cadeia α do colágeno tipo I apresenta uma massa molecular de 140 kDa e uma composição química muito peculiar, sendo extremamente ricas no amino-ácido glicina, encontrado na proporção de aproximadamente 30% do total de aminoácidos da molécula. Além da alta concentração de glicina, as cadeias α apresentam em sua composição hidroxiprolina e hidroxilisina, que são raramente encontrados em outras proteínas. Esta composição é caracterizada pela repetição da fórmula trimérica Pro-X-Gly, sendo a presença da prolina e glicina fundamentais para a estabilização da α -hélice. A hidroxilação dos resíduos de lisina e a posterior glicosilação do amino-ácido são importantes para a polimerização das cadeias α e a formação da tripla hélice (Blumenkrantz et al., 1984). As cadeias do colágeno tipo I são secretadas no meio extracelular na forma de pró-colágeno, contendo polipeptídeos N e C-terminais que são removidos por enzimas específicas. Após clivagem enzimática, ocorre a polimerização das moléculas de tropocolágeno formando fibrilas. Homotrímeros, moléculas formadas por três cadeias $\alpha 1(I)$, são observados em processos inflamatórios, tecidos embrionários, tecidos de reparação, fibroses, quelóides e em tecidos neoplásicos (Wright and Leblond, 1989). Por outro lado, homotrímeros formados por três cadeias $\alpha 2(I)$ nunca foram detectados. O controle da quantidade de colágeno presente em um tecido é dependente basicamente de dois eventos:

regulação transcricional, traducional e início da síntese das cadeias polipeptídicas e regulação do equilíbrio dinâmico entre síntese-degradação (Birkedal-Hansen, 1993).

A secreção do colágeno tipo I e o transporte através das organelas celulares até a membrana celular segue a mesma via de outras proteínas. O processamento, maturação e secreção dos heterotrímeros de colágeno no RE envolve uma série de eventos caracterizados pela interação de cadeias nascente com proteínas *chaperones*.

4.4. METALOPROTEINASE DE MATRIZ

Interações entre células e MEC são cruciais para o normal desenvolvimento e função do organismo. A modulação destas interações, em parte, é regulada através da ação de um sistema proteolítico responsável pela hidrólise dos componentes da MEC. Por controlar a integridade e composição da MEC, este sistema enzimático participa de muitos fenômenos importantes como proliferação, diferenciação e morte celular. A relação síntese-degradação de MEC deve ser um mecanismo altamente controlado, visto que proteólise descontrolada pode contribuir para anormalidades do desenvolvimento e para geração de muitas condições patológicas caracterizadas ou por uma excessiva degradação ou por falta de degradação dos componentes. Membro das famílias das MMPs e dos ativadores de plasminogênio são os principais reguladores da degradação da MEC (Birkedal-Hansen, 1993).

MMPs compreendem uma família de enzimas que regulam a composição da MEC. As MMPs são endopeptidases conhecidas pela habilidade de degradar diversos constituintes da MEC, tão bem quanto outras proteínas (Johnson et al., 1998). A família MMP está presente em plantas, invertebrados e vertebrados e é formada por, pelo menos, sessenta e seis membros que exibem similaridades estruturais e funcionais (Nassova et al., 1998). Apesar da grande similaridade estrutural e funcional, todos os membros deste grupo são codificados por genes distintos. As MMPs desempenham papel importante em vários processos fisiológicos e patológicos, como na involução pós-parto (Weeks et al., 1976), na reabsorção óssea (Shapiro et al., 1993; Okada et al., 1995), na inflamação através da migração leucocitária (Knauper et al., 1993), na osteoartrite (Woessner, 1994; Vijaykumar et al., 1995), na doença periodontal (Birkedal-Hansen, 1993), no crescimento e expansão de tumores benignos (Autio-Hermainen et al., 1993) e na invasão e metástase (Declerck et al., 1992).

Todas as MMPs são secretadas na forma de um zimógeno ou como um complexo enzima-inibidor, sendo que sua ativação se dá em duas etapas. Inicialmente o zimógeno sofre clivagem proteolítica que resulta na remoção da porção N-terminal. A clivagem pode ser feita por várias enzimas proteolíticas como a tripsina, plasmina, catepsina B e elastase. Numa segunda etapa, a enzima sofre autodigestão que resulta na sua forma ativada (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990). Acredita-se que a ativação é causada pela ruptura da ponte existente entre o amino-ácido cisteína e o íon zinco, o qual bloqueia o sítio ativo da molécula. Outra característica comum entre as MMPs é a dependência do íon zinco e do íon cálcio. A interação do íon zinco com dois resíduos de histidina presentes no domínio catalítico da molécula tem importância crucial para o funcionamento adequado das MMPs. Os dois átomos de cálcio conferem estabilidade para a estrutura terciária da proteína (Dioszegi et al., 1995).

Em humanos são encontrados dezessete membros da família MMP, o qual incluem as recentes descobertas da enamelisina humana e da enzima codificada pelo gene MMP-20 em indivíduos portadores da febre familiar do Mediterrâneo (Llano et al., 1997; Bernot et al., 1997). As principais MMPs em humanos são pertencentes às subclasses das collagenases intersticiais, gelatinases e estromelisinases. Têm dividido as MMPs em subclasses baseando na especificidade ao substrato. Apesar de usada em muitos trabalhos, muitos autores têm contestado essa classificação, pois embora satisfatória para o grupo das collagenases, todas elas apresentando especificidades ao colágeno tipo I, II e III, é insatisfatória ao grupo das gelatinases, também chamadas de collagenases tipo IV. Isto se deve ao fato de que as estromelisinases também digerem colágeno tipo IV. Recentemente um quarto grupo de MMPs foi descrito, as metaloproteinases de matriz de membrana celular (MT-MMP). Este grupo é formado por três enzimas que estão associadas com a ativação das gelatinases (Sato et al., 1994; Takino et al., 1995; Will and Hinzmann, 1995).

Dentre o grupo das MMPs, as collagenases intersticiais são as mais específicas. Foram as primeiras a serem descritas em 1962 e, durante as últimas décadas, têm sido objeto de muitos estudos que versam desde sua expressão e distribuição, estrutura química e molecular, até participação em processos normais e patológicos. Estas enzimas são as únicas com capacidade de clivar as triplas hélices dos colágenos tipo I, II e III em condições fisiológicas, tornando estas moléculas susceptíveis à ação de outras enzimas (Souza et al., 1993). Existem três tipos de collagenases intersticiais que, apesar de exibirem grande semelhança estrutural e de especificidade, são codificadas por genes distintos. A do primeiro tipo, que exibe uma

distribuição ambígua, é sintetizada por fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, macrófagos, osteoblastos, condrócitos e osteoclastos (Birkedal-Hansen, 1993). Quando analisada em eletroforese de gel de poliacrilamida, a collagenase de fibroblastos (MMP-1) aparece como várias bandas com massa molecular variando entre 57 e 52 kDa. Esta variação provavelmente se deve a proteólise parcial da molécula. A do segundo tipo é produzida exclusivamente por leucócitos polimorfonucleares e é designada de MMP-8. Apesar de possuir um núcleo protéico muito semelhante a MMP-1, a alta taxa de glicosilação faz com que essa molécula possua uma massa molecular de 75 kDa. Ao contrário da MMP-1, que é rapidamente secretada após a sua síntese, a MMP-8 é armazenada em grânulos intracelulares que só são liberados após a ativação das células (Hibbs and Bainton, 1989). A terceira enzima do grupo das collagenases intersticiais, MMP-13, foi demonstrada ser produzida pelas mesmas células que produzem MMP-1, e apresenta atividade degradatória exclusivamente sobre colágenos fibrilares (Freije et al., 1994). Existem também as collagenases bacterianas que, clivam as cadeias α do colágeno nos inúmeros sítios ricos no amino-ácido glicina. Estas são importantes ferramentas laboratoriais devido a sua grande afinidade e especificidade a tripla hélice da molécula do colágeno.

As gelatinases são enzimas capazes de clivar a região helicoidal do colágeno tipo IV (Murphy et al., 1989). Estas enzimas são capazes de degradar colágeno tipo V e VII, elastina e gelatina (colágeno desnaturado). A gelatinase de 72 kDa (MMP-2) parece ser capaz de clivar também o colágeno tipo X (Welgus et al., 1990), porém não é ativa sobre os colágenos fibrilares, lamininas e proteoglicanos. Contudo, esta enzima foi demonstrada degradar colágeno tipo I nativo em condições específicas (Aimes and Quigley, 1995). A especificidade destas enzimas sobre o colágeno tipo IV parece indicar que elas participam da remodelação e degradação da membrana basal. É também possível que a atividade gelatinolítica destas enzimas esteja relacionada com a remoção de fragmentos de colágeno desnaturado que sofreram ação de outras MMPs (Reponen et al., 1992; 1994).

A MMP-2 é talvez a MMP mais abundante, sendo secretada por fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, macrófagos, osteoblastos e condrócitos, estando também presente no plasma sangüíneo (Birkedal-Hansen, 1993). A gelatinase de 92 kDa (MMP-9) é produzida por neutrófilos polimorfonucleares, queratinócitos e macrófagos, e, ocasionalmente, por fibroblastos. Estudos por hibridização *in situ* têm demonstrado que a MMP-9 é fortemente expressa nos tecidos embrionários de ratos (Reponen et al., 1994).

O terceiro grupo de MMPs é formado pelas estromelisinases. As estromelisinases dos tipos 1 e 2 (MMP-3 e MMP-10, respectivamente) são capazes de digerir várias proteínas da MEC como a laminina, fibronectina, proteoglicano (núcleo protéico), colágeno tipo IV, V, VII, e X, colágeno desnaturado (gelatina) e caseína (Chin et al., 1985). A MMP-3 é expressa por várias células do estroma conjuntivo quando induzidas por fatores do crescimento e citocinas (IL-1, EGF, TNF- α e PDGF) (Kerr et al., 1988; MacNaul et al., 1990), e, quando analisada em gel de poliacrilamida, apresenta um peso molecular entre 60 e 53 KDa. Esta enzima parece não ser expressa por leucócitos ou queratinócitos. A MMP-10 é expressa em menor quantidade e, aparentemente, pelas mesmas células que expressam MMP-3. Apresenta uma massa molecular semelhante a MMP-3, porém esta enzima parece não responder a indução por fatores de crescimento (Birkedal-Hansen, 1993).

A atividade proteolítica das MMPs é regulada em muitos níveis, o qual incluem transcrição, secreção, ativação e inibição. Este último é realizado a nível extracelular através da ação de uma família de inibidores específicos chamados TIMP. Quatro membros da família TIMP, TIMP-1 a TIMP-4, já foram caracterizados (Borden and Heller, 1997; Gomis-Ruth et al., 1997). Estes inibidores estão distribuídos pelos tecidos e fluídos corporais e são secretados por diversos tipos celulares, incluindo fibroblastos, neutrófilos, células endoteliais, condrócitos e células neoplásicas.

O mecanismo de ação da família TIMP é complexo, e envolve numerosos pontos de interação com as MMPs. Porém, o evento principal parece ser resultado da ligação ao domínio catalítico N-terminal do sítio ativo da molécula (Murphy et al., 1994). No caso das gelatinases, recentes estudos demonstraram que TIMPs ligam a forma de zimógeno da enzima (Fridman et al., 1993). Esta interação proporciona um nível extra de regulação. TIMP-2 forma um complexo trimolecular na superfície celular com MT1-MMP e pró-MMP-2, o qual é responsável pela regulação dos níveis da enzima ativa (Butler et al., 1998). TIMP-1 parece ser mais efetivo na regulação das collagenases, enquanto que TIMP-2 é mais efetivo com o grupo das gelatinases (Howard et al., 1991).

4.5. CITOCINAS

Muitos eventos biológicos são regulados por interações celulares, que podem ser caracterizados em dois tipos: interações adesivas, isto é, entre membranas celulares; e interações mediadas por substâncias biológicas, tal como, citocinas (Albert et al., 1994). Citocinas são proteínas solúveis de pequena massa molecular

produzida por diferentes tipos celulares que, apresentam a função de alterar o comportamento ou as propriedades celulares a nível local ou sistêmico (Abbas et al., 1997). Incluem proteínas do grupo das citocinas: as interleucinas, os interferons, os fatores de crescimento, os fatores citóxicos, os fatores inibidores ou ativadores e os fatores estimulantes de colônias. As citocinas apresentam importantes funções em inúmeros processos biológicos tal como proliferação, diferenciação, regeneração, inflamação e na resposta imunológica celular e humoral.

Como via de regra, a síntese das citocinas é induzida, embora tenha sido descrito que alguns fatores são produzidos de forma constitutiva. Após ativação, as células são capazes de produzir diferentes tipos de citocinas ao mesmo tempo. Muitas destas células também expressam receptores específicos de forma constitutiva ou induzida. As citocinas foram classificadas com base na sua origem e função, embora seja conhecido que muitas são geralmente moléculas multifuncionais e são produzidas por diversos tipos celulares.

Citocinas foram originalmente identificadas e descritas em processos imunológicos e inflamatórios, e a grande maioria das publicações nesta área enfocam a participação destas proteínas nestes processos. Recentemente tem sido demonstrado que estas proteínas apresentam funções importantes em condições de homeostasia celular e que, desregulada expressão e produção pode estar relacionada com a etiologia de doenças. A revisão aqui apresentada sumariza as principais funções e enfoca a participação destas moléculas em processos fibróticos. Tabela 4 descreve as principais citocinas relacionadas com a estimulação da proliferação celular e síntese de MEC.

4.5.1. Fator de Crescimento Transformante- β (TGF- β 1)

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

potente fator mitótico para fibroblastos, não apenas por induzir a células entrarem na fase S, mas também por incurrir a fase G₁ do ciclo celular (Kim et al., 1998). Por outro lado, inibe o crescimento celular de queratinócitos, células endoteliais, células neuronais, linfócitos e hepatócitos, além de estimular a síntese de diversas proteínas da MEC como colágeno, fibronectina e proteoglicanos (Ignatz and Messague, 1986; Raghow et al., 1987; Chen et al., 1987). TGF- β também inibe a degradação da MEC por inibir a síntese de MMPs e estimular a síntese de TIMPs (Edwards et al., 1987; Laiho and Keski-Oja, 1989; Overall et al., 1989a). TGF- β estimula o crescimento de vasos sangüíneos, processo chamado angiogênese. TGF- β 1, 2 e 3 são as principais isoformas produzidas por células humanas; TGF- β 1 e TGF- β 2 são produzidas por muitos tipos celulares, enquanto que TGF- β 3 é principalmente expressa por células de origem mesenquimal (Massague, 1990). Estas moléculas são secretadas como homodímeros na forma latente e, devem ser ativados para desempenhar suas funções biológicas.

A expressão e produção de TGF- β têm recentemente sido amplamente analisada, *in vivo* e *in vitro*, em diversos modelos de fibrose decorrentes de processos inflamatórios ou senis (Awad et al., 1998; Peters et al., 1998; Bitzer et al., 1998; Sibalic et al., 1998). De forma geral, estes estudos demonstraram uma exacerbada expressão de TGF- β em associação com a progressão da fibrose. A indução de TGF- β pelo tratamento com ciclosporina parece ser o principal fator relacionado com os efeitos colaterais da droga incluindo a hiperplasia gengival (Nicholson et al., 1998; Hojo et al., 1999).

4.5.2. Interleucina-1 (IL-1)

IL-1 é um polipeptídeo com grande número de atividades e funções na resposta imunológica e inflamatória e em condições de homeostasia celular (Tatakis, 1993; Havemose-Poulsen and Holmstrup, 1997). IL-1 é sintetizada por vários tipos celulares incluindo macrófagos, monócitos, linfócitos, células endoteliais, células nervosas, queratinócitos e fibroblastos. Existem duas principais isoformas de IL1: IL-1 α e IL-1 β , o qual apresentam apenas 27% de homologia a nível de aminoácidos, mas apresentam funções biológicas similares. As duas isoformas ligam aos mesmos receptores celulares, que são encontrados em muitos tipos celulares. Enquanto IL-1 α parece estar principalmente associada com mecanismos de estimulação autócrinas, IL-1 β está associada com mecanismos parácrinos (Hazuda et al., 1988). A terceira isoforma da família IL-1, denominada IL-1ra (IL-1 antagonista ao receptor), foi

demonstrada funcionar como um inibidor para as outras duas formas. IL-1ra liga ao receptor celular mas como é biologicamente inativa, atua bloqueando a ação das outras IL-1 (Abbas et al., 1997). Por atuar competindo com a ação de IL-1, IL-1ra pode ser importante ferramenta farmacológica para doenças causadas por uma excessiva e desregulada produção de citocinas, como por exemplo na artrite (Bresnihan et al., 1998). Recentemente um quarto membro desta família foi descrito, IL-1 γ , o qual divide com IL-12 a capacidade de estimular células NK a secretar interferon- γ (Fogler et al., 1998).

IL-1 é conhecida por estimular a proliferação de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais e, estimular em fibroblastos a síntese de colágeno, colagenase, fibronectina e prostaglandinas (Okada and Murakami, 1998). IL-1 vem sendo amplamente estudada em tecidos periodontais onde funciona como componente fundamental para a homeostasia tecidual. Contudo, quando produzida em elevados níveis está intimamente associada com a destruição tecidual e reabsorção óssea. Em condições de periodontite, IL-1 parece ser a principal molécula responsável pela estimulação de fibroblastos e macrófagos a produzirem elevados níveis de MMPs e outras enzimas degradatórias (Mochan et al., 1988; Meikle et al., 1989; Alvares et al., 1995).

4.5.3. Interleucina-6 (IL-6)

IL-6 é secretada por linfócitos T e B, monócitos, células endoteliais e fibroblastos (Kishimoto, 1990), e é a principal mediadora da resposta inflamatória e imune, da injúria tecidual e da reabsorção óssea (Gemmell and Seymour, 1993; Reinhardt et al., 1993; Suzuki et al., 1998). A principal função de IL-6 é na indução da transformação e maturação de plasmócitos e na secreção de imunoglobulinas. Recentes publicações demonstraram que fibroblastos derivados de doenças fibróticas como a esclerose sistêmica de pele e a fibrose pulmonar induzida por drogas ou abestros, expressam elevados níveis de IL-6 mRNA e proteína em paralelo com o aumento na produção de colágeno (Takemura et al., 1998; Zuita-Salinas et al., 1998; Coker and Laurent, 1998). A expressão de IL-6 é regulada por inúmeras outras citocinas, incluindo IL-1, IL-2, TNF- α e PDGF (Kohase et al., 1987; Takigawa et al., 1994). Os níveis de IL-6 no fluido gengival estão relacionados com a agressividade da doença periodontal do adulto (Geivelis et al., 1993). Recentemente, Parkar et al. (1998) demonstraram que a expressão e produção de IL-6 por fibroblastos gengivais é regulada por hormônios sexuais masculinizantes.

4.5.4. Fator Necrosante de Tumor- α (TNF- α)

TNF- α foi originalmente identificado e descrito como um fator necrosante encontrado no soro de animais tratados com lipopolissacarídeos (LPS; Abbas et al., 1997). Em baixas concentrações, LPS estimula macrófagos a atuarem como ativadores das células B e como estimuladores da resposta inflamatória, o qual contribui para a eliminação do antígeno. Contudo, altas concentrações de LPS causam injúria tecidual, coagulação intravascular disseminada, choque e morte. Neste modelo experimental está agora claro que TNF- α é o principal mediador dos efeitos de LPS (Abbas et al., 1997).

A principal fonte produtora de TNF- α são macrófagos ativados em resposta a estímulos inflamatórios, infecciosos e tumorais, embora outras células como linfócitos T e NK e mastócitos também produzem pequenas quantidades (Beutler, 1992). A função de TNF- α ainda é incerta. Em diversos modelos experimentais foram propostas diferentes funções como indução de fibroblastos a síntese de collagenase, estimulação da reabsorção óssea e cartilaginosa, inibição da síntese de colágeno e da proliferação celular (Knittel et al., 1997; Solis-Hemuzo et al., 1988; Houghum et al., 1998). Em vários tipos celulares, TNF- α induz a síntese de IL-1 e prostaglandinas.

TNF- α parece ser um mediador importante *in vitro* da fibrose pulmonar (Coker and Laurent, 1998). TNF- α estimula a proliferação de fibroblastos pulmonares além de estimular a síntese de colágeno após administração de bleomicina (Broekelmann et al., 1991). Mutantes inativos de TNF- α capazes de ligar aos receptores celulares inibiram a fibrose pulmonar em ratos após indução por bleomicina e sílica (Piquet and Vesin, 1994).

Tabela 4. Principais citocinas relacionadas com a proliferação celular e síntese de MEC.

Citocina	Principais Fontes	Principais Funções
TGF- β	• Células envolvidas na resposta inflamatória e imune • Fibroblastos • Células endoteliais • Queratinócitos	• Estimula ou inibe proliferação celular • Estimula síntese de MEC • Inibe produção de MMPs • Estimula produção de TIMPs • Regula crescimento celular • Estimula diferenciação celular
IL-1	• Células envolvidas na resposta inflamatória e imune • Fibroblastos • Células endoteliais • Queratinócitos • Células neuronais	• Estimula coagulação sangüínea • Febre • Estimula proliferação celular • Estimula síntese de MEC e MMPs • Estimula diferenciação celular • Estimula produção de IL-6 e TNF-α
IL-6	• Células envolvidas na resposta inflamatória e imune • Fibroblastos • Células endoteliais	• Estimula diferenciação de células B e síntese de IgG • Estimula síntese de MEC • Estimula crescimento celular
TNF- α	• Macrófagos • Monócitos • Células T	• Estimula síntese de MMPs • Estimula reabsorção óssea e cartilaginosa • Inibe síntese de colágeno • Inibe proliferação celular

Adaptado de Abbas et al. (1997) e Okada and Murakami (1998)

5. PROPOSIÇÃO

O objetivo desta dissertação foi analisar e caracterizar a proliferação celular e a expressão e produção de colágeno e suas proteínas chaperones, citocinas e metaloproteinases de matriz e seus inibidores teciduais em linhagens celulares de fibroblastos de quatro pacientes com generalizada fibromatose gengival hereditária.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Pacientes

Fibroblastos gengivais foram obtidos de fragmentos de gengiva de quatro indivíduos com FGH e de quatro com GN, usados como controle. Todos os pacientes com FGH foram de uma mesma família, e apenas foram selecionados os indivíduos com generalizada hiperplasia gengival de aspecto fibroso e sem sinais de inflamação. A média de idade destes pacientes com FGH foi de 22,1 anos e este grupo incluía três homens e uma mulher. Tecido gengival normal foi obtido através de biópsias da papila interdental entre os dentes 13 e 14 de três voluntários do sexo masculino e um do sexo feminino. A média de idade deste grupo foi de 26 anos. Todos os indivíduos apresentaram gengiva clinicamente normal sem evidências de inflamação ou hiperplasia. Nenhum paciente deste estudo apresentou história de uso de medicamentos relacionados a hiperplasia gengival. Tabela 4 descreva as características clínicas dos pacientes utilizados neste trabalho.

Tabela 4. Características clínicas dos pacientes.

Linhagem Celular	Sexo	Idade	Localização	Graduação Clínica*
Controle				
GN1	F	29	13-14	0
GN3	M	26	13-14	0
GN4	M	26	13-14	0
GN5	M	23	13-14	0
FGH				
FGH2	F	28	34-36	1
FGH3	M	22	13-23	2
FGH5	M	20	13-23	2
FGH7	M	18	33-34	2

*Graduação clínica. 0 - excelente condição gengival, sem sinais de inflamação ou hiperplasia gengival, 1 - aumento gengival leve, 2 - aumento gengival moderado e 3 - aumento gengival agressivo.

6.2. Cultura Primária

Fragmentos gengivais de pacientes normais e com FGH foram removidos e imersos em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) acrescido de 10% soro fetal bovino (Cultilab Ltda, Campinas-SP), 125 mg/ml ampicilina G e 50 ng/ml anfotericina B à 4° C e levados imediatamente a geladeira, onde foram mantidos por 16 h. Os fragmentos foram lavados três vezes na mesma solução, cortados em fragmentos de aproximadamente 1 mm³ e transferidos para frascos de cultura de 25 cm², que foram mantidos à temperatura de 37° C, atmosfera úmida contendo 5% CO₂. O crescimento celular foi monitorado diariamente e o meio de cultura trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular. Após 15 dias a concentração de ampicilina G foi reduzida para 50 mg/ml. Em todos os procedimentos de cultivo foram observados cuidados para a manutenção da esterilidade.

6.3. Subcultura

Após atingirem a subconfluência, as células foram subcultivadas. No subcultivo, o meio de cultura foi removido e as células lavadas em solução de tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) acrescido de 0,5 mM ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA, Sigma). Em seguida, as células foram separadas do assoalho da garrafa de cultura pela adição de 1 ml de tripsina (Sigma) à 0,2%. A tripsina foi inativada com 10 ml de meio de cultura acrescido de 10% soro fetal bovino. A suspensão de células foi então centrifugada a 400 g por 2 min, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas e plaqueadas em garrafas de 25 cm². Algumas amostras de células foram ressuspensas em meio de cultura acrescido de 25% soro fetal bovino e 10% dimetil sulfoxido (DMSO, Sigma) e congeladas em nitrogênio líquido, para uso posterior.

Para o descongelamento das células, os criotubos foram imersos em banho de água à 37° C e as células transferidas para um tubo contendo 10 ml de meio de cultura. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 5 ml de meio de cultura e colocadas em frascos de 25 cm².

Todos os procedimentos apresentados nesta dissertação foram realizados utilizando células entre a terceira e décima passagens.

6.4. Análise de Crescimento Celular

Fibroblastos de GN e FGH (25.000 células/well) em 2 ml de DMEM acrescido de 10% soro fetal bovino foram plaqueados em placas de cultura de 24-wells

(Corning Sci Prod Inc, Acton MA, USA) e incubados a 37° C, atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Transcorrido 2 h de incubação, os wells foram gentilmente lavados com PBS e o meio de cultura substituído por DMEM contendo 1% soro fetal bovino. Após 16 h, as células foram novamente incubadas com DMEM acrescido de 10% soro fetal bovino. O índice de crescimento celular foi determinado por contagem da população celular nos dias 2, 4, 7, 9 e 11 usando um Coulter Counter (Coulter Eletronics, Luton, England). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

6.5. Ensaio Colorimétrico de MTT

A metodologia utilizada foi uma modificação do ensaio original descrito por Nosman (1983). Fibroblastos de GN e FGH (1.000; 2.000; 4.000; 6.000; 8.000; 10.000 células) em meio de cultura foram plaqueados em triplicata em wells de uma placa de cultura de 24-wells (Corning) e cultivados por três dias. Transcorrido este período, o ensaio colorimétrico de MTT foi realizado. Resumidamente, 100 µl de 3,4,5-dimethythiazol-2yl0-2,5-diphenytetrazolium bromide (MTT, Sigma) a uma concentração de 5 mg/ml em PBS foi adicionado para cada well. As placas foram incubadas à 37° C por 4 h. Após incubação, o meio de cultura foi removido, os wells lavados e 200 µl de 1% álcool-ácido foi adicionado para solubilizar o produto de metabolismo das mitocôndrias, o formazan azul. Após solubilização, a solução foi transferida para placas de 96-wells, o qual continha em cada well 20 µl da solução aquosa de 3% SDS (Bio Rad Lab, Hércules, CA, USA). A densidade óptica foi determinada usando um o fotômetro automático à 550 nm (Dynatech MR400).

6.6. Coloração das Regiões Organizadoras Nucleolares Arginofilicas (AgNOR)

A técnica de AgNOR foi adaptada da original descrita por Chatterjee et al. (1997). Fibroblastos de GN e FGH foram plaqueados a uma densidade de 25.000 células/well em lâminas de cultura de 2-wells e mantidas à 37° C, atmosfera úmida contendo 5% CO₂ por 24 h. Em seguida, as células foram lavadas com solução de PBS, fixadas em 70% etanol e rehidratadas em soluções decrescentes de etanol. As células foram então incubadas por 30 min à 37° C com a solução composta de 1 parte de 1% gelatina (Sigma) em solução aquosa de 1% ácido fórmico (Reagem, Rio de Janeiro-RJ) e 2 partes de solução aquosa de 50% nitrato de prata (Merck S.A., Rio de Janeiro-RJ). Os AgNORs foram visualizados em microscopia de luz e em cada linhagem celular, o número e tamanho foram determinados usando o sistema de análise de imagem Optimas 4.0. Foram contadas 500 células em 5 lâminas independentes para cada linhagem celular.

6.7. Ensaio de Incorporação de Bromodeoxiuridina (BrdU)

Células foram plaqueadas na concentração de 25.000 células/well em lâminas de cultura e cultivadas à 37° C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Transcorrido 24 h de incubação, as células foram lavadas e meio de cultura fresco acrescido de BrdU na diluição de 1:1.000 foi adicionado. Após 1 h de incorporação, as células foram lavadas e fixadas em 70% etanol por 15 min. A incorporação de BrdU em células em proliferação foi revelada através de análise imunohistoquímica utilizando protocolos descritos pelo fabricante (Kit de proliferação celular, Amersham Life Sci Inc., Arlington IL, USA). O índice de incorporação expresso como porcentagem de células marcadas com BrdU foi determinado por contagem de 500 células de cada linhagem de fibroblastos utilizando o sistema de imagem Optimas 4.0.

6.8. Análise Imunohistoquímica do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA)

Fibroblastos de GN e FGH foram plaqueados em lâminas de culturas de células (25.000 células/well), crescidos por 24 h e, em seguida, fixados em 70% etanol. Para prevenir ligação inespecífica, as células foram tratadas com 1% albumina de soro bovina (BSA, Sigma) por 1 h previamente a exposição ao anticorpo monoclonal anti-PCNA (diluição 1:3.000, Dako Corp, Carpinteria CA, USA). A revelação foi realizada através do sistema de anticorpos ABC (Kit Duet-StrepABC Complex/HRP, Dako) e 3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma). Os resultados foram expressos como porcentagem de células positivas através da contagem de 500 células de cada linhagem de fibroblastos de GN e FGH.

6.9. Análise da Síntese de Colágeno

A análise da síntese de colágeno foi realizada pela técnica descrita por Webster and Harvey (1979) com pequenas modificações. Fibroblastos de GN e FGH foram plaqueados em wells de placa de cultura de 24-wells a uma concentração de 50.000 células/well, e incubados em DMEM contendo 10% soro fetal bovino. Após 16 h, cada well de uma placa foi lavado e substituído por DMEM acrescido de 50 mg/ml de ácido ascórbico (Sigma) e 10 µCi/ml [³H]-prolina (New England Nuclear, Boston MA, USA). Os wells foram lavados três vezes e colágeno extraído de cada well pela adição de 1 M ácido acético (500 µl) contendo 1 mg/ml de pepsina (Sigma) por 16 h. O conteúdo dos wells foi transferido para tubos e centrifugados por 30 min a 14.000 rpm. Colágeno foi precipitado pela adição de 10 partes da solução 25% NaCl em 0,5 M ácido acético. Após precipitação por 2 h à 4° C, os tubos foram centrifugados e o

pellet redissolvido em solução de 0,15 M NaCl em 0,05 M Tris-HCl pH 7,5. Colágeno foi novamente precipitado com a adição de 4,5 M NaCl em mesmo tampão. Após 2 h, os tubos foram centrifugados, os sobrenadantes descartados e o colágeno lavado com 20% etanol. O pellet final foi redissolvido em 0,5 M ácido acético. Radiatividade foi determinada através de um contador de cintilação. Uma segunda placa utilizada para determinar a proliferação celular foi cultivada da mesma maneira mas não exposta ao material radiativo.

Para análise das cadeias de colágeno, alíquotas de colágeno marcado com ^3H -prolina foram misturadas com 1% SDS e incubadas por 30 min à 60° C previamente a análise por eletroforese interrompida (Sykes et al., 1976) em 6% SDS-PAGE. Em seguida, os géis foram analisados por autorradiografia.

6.10. Marcação de Proteínas com Metionina Radiativa

Nos instantes onde houve a necessidade de analisar as proteínas nascentes, as células foram lavadas em PBS e incubadas com DMEM sem o aminoácido metionina (Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA). A este meio foi acrescentado ^{35}S -metionina na concentração de 100 $\mu\text{Ci/ml}$ (New England Nuclear). As células foram cultivadas por 1 h à temperatura de 37° C, atmosfera úmida contendo 5% CO_2 .

6.11. Imunoprecipitação

Fibroblastos gengivais de pacientes normais e com FGH cultivados por 1 h em DMEM acrescido de ^{35}S -metionina foram coletados e incubados com tampão de lise contendo 100 mM Tris-HCl, pH 7,2; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 1% deoxicolato de sódio; 1% SDS e sonificados por 10 s. Após centrifugação, o sobrenadante foi incubado por 5 h em agitação à 4° C com um dos seguintes anticorpos: anti-Hsp47, anti-Grp78, anti-Grp94 (Stressgen, Victoria BC, CA) e anti-colágeno tipo I (Biodesing, Keenebunk Port ME, USA) na concentração de 1:2,000. Os imunocomplexos proteína-anticorpo foram precipitados pela adição de 50 ml proteína-A-Sepharose. Os imunocomplexos ligados a proteína-A-Sepharose foram lavados três vezes em tampão de lise acrescido de 0,05% Tween 20 e uma vez em solução 10 mM Tris-HCl, pH 7,4. A amostra foi ressuspensa em tampão de amostra redutor (2% SDS; 125 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10% glicerol; 0,001% azul de bromofenol; 2% mercaptoetanol) fervida por 5 min e separada eletroforéticamente em gel 4-20% gradiente linear SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Em seguida, o gel foi fixado em solução 7% ácido acético por 30 min, incubado por 1 h em solução Amplify (Amersham Inc.), seco e autorradiografado.

6.12. Digestão com Colagenase Bacteriana

Após imunoprecipitação utilizando anticorpos anti-Hsp47, imunocomplexos foram ressuspensos em tampão de ativação (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 400 mM NaCl; 5 mM CaCl_2 ; 30 mM KCl; 10 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil-PMSF; 2 mM N-etilmaleimida-NEM) acrescido de 50 U/ml de colagenase bacteriana (Sigma) e incubados à 37° C por 30 min. Tampão de amostra foi então adicionado e após fervura por 5 min, as amostras foram analisadas por SDS-PAGE e autorradiografia (como descrito anteriormente).

6.13. Ensaio de Ligação à Gelatina Sepharose

Células marcadas por 30 min com ^{35}S -metionina foram incubadas por 30 min em solução contendo 1% Nonidet p40 (NP-40); 150 mM NaCl; 50 mM tris-HCl, pH 8,0; 5 mM EDTA; 2 mM NEM; 2 mM PMSF, em seguida centrifugadas por 20 min a 6000 g. O sobrenadante foi misturado com 200 μl de gelatina Sepharose 4B (Pharmacia). Os *beads* de gelatina foram lavados duas vezes com mesma solução e uma vez com solução 10 mM tris-HCl, pH 6,8. As amostras foram submetidas a eletroforese em 10 % SDS-PAGE sobre condições redutoras. Os géis foram fixados, secos e autorradiografados.

6.14. Western Blot

Fibroblastos gengivais de pacientes normais e com FGH cultivados em DMEM foram coletados e incubados com tampão de lise contendo 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 5 mM EDTA; 1% Tween 20; 2 mM PMSF; 2 mM NEM e mantidos sob agitação à 4° C por 30 min. A concentração protéica foi determinada como descrito por Bradford (1976) utilizando BSA como padrão. Após determinação da dosagem protéica, a mesma concentração protéica de cada amostra foi misturada com tampão de amostra redutor, fervida por 5 min, separada eletroforéticamente em 4-20% gradiente linear SDS-PAGE e o material eletroforizado transferido para membrana de nitrocelulose (poro de 0,45 μm , Pharmacia Piscataway NJ, USA). As membranas foram tratadas por 1 h com PBS acrescido de 10% leite desnatado e incubado com anticorpos anti-Hsp47 na concentração 1:2,000 por 1 h. Após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a enzima peroxidase e reveladas com quimioluminescência seguindo normas do fabricante (Amershan Inc.). A

membrana foi então envolta por plástico e exposta ao filme radiográfico. Análise densitométrica foi realizada em um densitômetro modelo GS700 (Bio Rad).

Análise por Western blot utilizando anticorpos anti-Grp78, anti-Grp94, anti-colágeno tipo I e anti-PDI foi realizado, como descrito acima, em uma linhagem celular de FGH e uma de GN.

6.15. Efeito do Tratamento com Calor na Produção de Hsp47

Fibroblastos foram mantidos em condições normais de cultivo (estufa à 37° C, atmosfera úmida e 5% CO₂) e em condições de estresse, à 42° C por 1 h. Em seguida as células foram lisadas e as proteínas submetidas a análise por Western blot como descrito acima.

6.16. Efeito de Inibidores da Síntese de Colágeno na Produção de Hsp47

Fibroblastos de GN e FGH foram submetidos a ação de inibidores da síntese de colágeno pela exposição a uma das seguintes drogas: (a) exposição a 10 mM brefeldina A (Sigma), um agente antifúngico derivado de ácidos graxos capaz de impedir o transporte de proteínas recém-sintetizadas do RE para o aparelho de Golgi; (b) exposição a 0,3 mM α,α' -dipiridil (Sigma), um agente inibidor da atividade das enzimas prolil e lisil-hidroxilase e conseqüentemente inibidor da formação da tripla hélice de colágenos fibrilares; (c) exposição a 100 mg/ml cicloxamida (Sigma), um agente fúngico capaz de inibir a síntese de proteínas em formação; (d) exposição a 0,1 mM monensina, um inibidor do transporte de glicoproteínas em formação através dos compartimentos do complexo de Golgi; (e) exposição a 5 mM cálcio ionofore A23187 (Sigma) um agente capaz de bloquear a secreção de proteínas para o espaço extracelular através da inibição da formação de vesículas secretoras. Após exposição a estas substâncias por 2 h, as células foram lisadas e o extrato submetido a eletroforese e análise por Western blot. Células cultivadas em condições de homeostasia foram utilizadas como controle.

6.17. Imunofluorescência e Análise por Microscopia Confocal

Fibroblastos de FGH e GN foram plaqueados na concentração de 25.000 células/well em lâminas de cultura de células (Nalge Nunc Int, Naperville IL, USA) e incubadas à 37° C atmosfera úmida contendo 5% CO₂ por 24 h. Após fixação em 70% álcool, as células foram lavadas e tratadas com 10% soro normal de porco para prevenir ligação inespecífica. As células foram então incubadas com anticorpo anti-Hsp47 e/ou anti-cadeias $\alpha 1(I)$ na concentração de 1:100, lavadas e incubadas com

anticorpo secundário conjugado a fluoresceína (Sigma) e/ou a Texas Red (Biodesign) por 1 h. As células foram examinadas no fotomicroscópio Zeiss II equipado com epifluorescência. Em todas as reações controles negativos não mostraram nenhuma marcação.

Microscopia confocal foi realizada em um microscópio Zeiss modelo LSM 410 utilizando barreira de 590 nm para detectar Texas Red e barreira de 515-540 nm para gerar imagens do anticorpo conjugado a fluoresceína.

6.18. Pró-peptídeos de Colágeno

A sequência de cDNA contendo o domínio globular da porção N-terminal de pró- $\alpha 1(I)$ (resíduos 23-108), chamado NP1, foi preparado acoplado a proteína de fusão GST como descrito previamente por Hu et al. (1995). A expressão de NP1-GST foi induzida em bactérias e a purificação realizada por cromatografia de afinidade utilizando beads de Sepharose 4B-glutathione (Pharmacia) de acordo com as normas do fabricante. Para purificação de NP1, NP1-GST foi tratada com trombina (Pharmacia), dializada e a proteína glutathione-S-transferase (GST) removida pela passagem em coluna de Sepharose-glutathione. Os eluatos foram coletados, liofilizados, ressuspensos em água e a concentração determinada por espectrofotometria.

NP1 foi adicionado ao meio de cultura na concentração de 10, 20 e 40 nM por 24 h e a produção de colágeno e Hsp47 determinada por imunoprecipitação. Em alguns experimentos, NP1-GST foi diretamente adicionada ao meio de cultura e os pró-peptídeos visualizados por microscopia confocal ou imunoprecipitados utilizando anticorpos contra a proteína GST (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz CA).

6.19. RT-PCR (transcriptase reversa-reação de cadeia de polimerase)

A análise da expressão de Hsp47 por RT-PCR foi realizada em duas linhagens celulares de FGH e duas de GN. RNA foi extraído das culturas celulares pelo uso da técnica de isotiocianato de guanidina. Resumidamente, células foram lavadas e incubadas diretamente nos frascos de cultura com solução desnaturante de isotiocianato de guanidina (TRIzol, Gibco) por 5 min. Após lise celular, as amostras foram coletadas e transferidas para tubos de polipropileno (livres de RNase e DNase) e 0,2 ml de clorofórmio por mililitro de solução desnaturante foi adicionado. Após centrifugação, a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para tubos limpos e adicionou 0,5 ml de álcool isopropano por mililitro de solução desnaturante. O RNA

foi ressuspenso e a concentração determinada por espectrofotometria a 260 nm. Foi produzido uma concentração de RNA variando entre 0,2-0,7 mg/ml.

Dois mg de RNA total foram transcritos reversamente a cDNA adicionando a mistura contendo 1 ml de Oligo-dT (0,5 mg/ml), 2 ml de 10x tampão de síntese (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl), 1 ml da mistura de dNTPs e 1 ml de Superscript II RT (20 U/ml; Gibco). A mistura foi incubada por 50 min à 42° C e posterior 15 min à 70° C. A reação foi terminada pela adição de 1 ml de *E. coli* RNase H (2 U/ml; Gibco) por 30 min à 37° C. O cDNA resultante foi amplificado por PCR utilizando ³²P-dCTP. Os primers para Hsp47 foram sense 5' CAC ACT GGG ATG AGA AGT TTC A 3' e antisense 5' C TGT CCG GTG CAT CAT GCT AAC 3'; e para β -actina sense 5' TCA GAA GGA CTC CTA TGT GG 3' e antisense 5' TCT CTT TGA TGT CAC GCA CG 3'. β -actina foi utilizada como controle interno da reação. As reações foram iniciadas por desnaturação à 94° C por 5 min seguidas por 35 ciclos de 94° C por 30 s, 55° C por 1 min e 72° C por 22 s em um termociclador 9600 (Perkin Elmer Cetus, Emeryville CA, USA). Os produtos foram separados eletroforicamente em gel de 5% poliacrilamida/TBE (tampão Tris-borato-EDTA) e, em seguida, secos e expostos a filme radiográficos por no máximo 1 h. Análise densitométrica foi realizada como descrito acima.

A análise da expressão das MMPs e TIMPs foi realizada como descrito, mas utilizando eletroforese em gel de 1% agarose corado com brometo de etídeo para a visualização dos produtos do PCR. Os primers foram: MMP-1 sense 5' GGT GAT GAA GCA GCC CAG 3' e antisense 5' CAG TAG AAT GGG AGA GTC 3'; MMP-2 sense 5' CCA CGT GAC AAG CCC ATG GGG CCC C 3' e antisense 5' GCA GCC TAG CCA GTC GGA TTT GAT G 3'; TIMP-1 sense 5' TGC ACC TGT GTC CCA CCC CAC CCA CAG ACG 3' e antisense 5' GGC TAT CTG GGA CCG CAG GGA CTG CCA GGT 3'; TIMP-2 sense 5' CCG AAT TCT GCA GCT GCT CCC CGG TGC ACC CG 3' e antisense 5' GGA AGC TTT TAT GGG TCC TCG ATG TCG AG 3'. As reações foram iniciadas por desnaturação por 3 min à 93° C, seguidas por 40 ciclos de 93° C por 45 s, 58° C por 45 s e extensão à 72° C por 1,5 min.

6.20. Análise Citométrica

Células foram coletadas, lavadas e fixadas por 1 h em solução aquosa contendo 70% álcool absoluto (v/v). Após lavagem, as células foram incubadas com anticorpo anti-Hsp47 (diluído 1:100) seguidas por anticorpo secundário conjugado a fluoresceína e análise em citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Para análise de dupla coloração, iodeto de propídeo (PI, Sigma) foi adicionado a

uma concentração final de 50 mg/ml. PI também foi utilizado para análise do ciclo celular. Nestes experimentos, 1×10^6 células foram incubadas com PI em tampão citrato por 1 h, e em seguida, analisadas por citometria de fluxo. Um mínimo de 10.000 eventos foram coletados para cada amostra. A análise dos dados foi realizada no programa LYSYS II (Becton Dickinson). A porcentagem de células em G₁/0, S e G₂/M foi determinada por integração da área dos histogramas de DNA usando o programa Multicycle (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA).

6.21. Análise Zimográfica

Sobrenadantes de cultura de fibroblastos de GN e FGH crescidos na ausência de soro fetal bovino foram incubados com tampão de amostra não redutor e submetidos a eletroforese em 4-20% gradiente linear SDS-PAGE contendo 1,6 mg/ml de gelatina (Bio Rad), como substrato. Após eletroforese, o gel foi lavado duas vezes por 30 min em solução aquosa de 2% Triton X-100 e incubado em tampão de ativação composto por 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 5mM CaCl₂ por 16 h à 37° C. A seguir, o gel foi corado com Coomassie blue R250 (Bio Rad). As proteínas com atividades gelatinolíticas foram observadas como bandas negativas.

6.22. Influência da Neutralização de TGF- β 1 na Expressão e Produção de MMPs e TIMPs

A expressão de MMPs e TIMPs na presença de anticorpos neutralizantes foi determinada por RT-PCR. Fibroblastos foram plaqueados na concentração de 1×10^6 células/ frasco de 75 cm² e cultivados em DMEM/10% soro fetal bovino por 24 h. Após lavagem com PBS, o meio de cultura foi trocado para DMEM na ausência de soro fetal bovino. Transcorrido 24 h, o meio de cultura foi novamente trocado para DMEM sem soro fetal bovino contendo 0; 2,5; 5,0 e 10,0 mg/ml de anticorpos anti-TGF- β 1 (R & D Systems) e cultivados por um adicional de 24 h. A extração de RNA, síntese de cDNA e as reações de PCR foram realizadas como descrito previamente. O sobrenadante de cultura foi utilizado para ensaios zimográficos utilizando gelatina como substrato.

6.23. Produção de Citocinas-TGF- β 1, IL-6, IL-1 β e TNF- α

Células foram plaqueadas em placas de 24-wells a uma concentração de 50.000 células/well e cultivadas em DMEM contendo 10% soro fetal bovino por 24 h. O meio foi trocado para mesmo meio sem soro fetal bovino e as células incubadas por um adicional de 24 h para eliminar a influência de citocinas do soro. O meio de

cultura foi trocado novamente e as células cultivadas por 4 dias. Transcorrido este período, o meio contendo os produtos metabólicos das células foi congelado e as células separadas do assoalho da placa pela adição de tripsina. A concentração celular foi então determinada em um Coulter Counter.

O ELISA de captura para determinar os níveis de produção TGF- β 1, IL-6, IL-1 β e TNF- α utilizando o sobrenadante celular e anticorpos específicos foi realizado como descrito a seguir. Placas de 96-wells foram incubadas com um dos seguintes anticorpos: anticorpo monoclonal anti-TGF- β 1 humano (R&D Systems); anticorpo monoclonal anti-IL-6 humano (Endogen, Woburn MA, USA), anticorpo monoclonal anti-IL-1 β humano (Endogen) e anticorpo monoclonal anti-TNF- α humano (Endogen); na concentração de 1 mg/ml e mantidos a temperatura ambiente por 2 h e, então, à 4° C por 16 h. Os anticorpos foram descartados e os wells lavados três vezes com solução de PBS contendo 0,1% Tween 20. Sobrenadantes (100 μ l) foram adicionados para os wells e incubados por 2 h à temperatura ambiente. Previamente a quantificação de TGF- β 1, TGF- β latente foi ativada pelo tratamento com 0,167 M HCl por 10 min seguido por neutralização com 1,2 N NaOH em 0,5 M tampão HEPES. Após lavagem, adicionou os anticorpos primários e secundários anti-camundongo conjugado a biotina. A reação foi revelada pela adição de 200 μ l da mistura composta de 1 parte de avidina-peroxidase (Sigma) na concentração de 1:5,000 e 1 parte de 0,2 mg/ml de o-fenilenodiamina (Sigma) em 0,1 M tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo 0,05% H₂O₂ (Sigma). A reação foi terminada pela adição de 2 M H₂SO₄ e a absorbância avaliada à 492 nm utilizando um leitor de ELISA Titertek. Os níveis de produção das citocinas foram determinados por comparação da absorbância de padrões. Os resultados são expressos como média da produção/célula $\pm$ desvio padrão de 6 duplicatas.

6.24. Análise Estatística

Os resultados quantitativos foram expressos como média $\pm$ desvio padrão dos grupos de fibroblastos. Para a análise das diferenças dos grupos foi utilizado o teste de Student com critério bi-caudal.

7. RESULTADOS

7.1. Características clínicas e histológicas

Clinicamente os indivíduos afetados apresentaram exacerbado aumento gengival de aspecto fibroso, crescimento lento e progressivo. Em todos os casos, o aumento foi generalizado sendo a região anterior o sítio de maior agressividade (Fig. 1). O tecido gengival removido cirurgicamente mostrou típicas características histológicas. Comparando com a gengiva de pacientes do grupo controle, a gengiva de indivíduos com FGH mostrou um tecido conjuntivo fibroso com densos e numerosos feixes de fibras colágenas. O epitélio acantótico e hiperplásico projeta em direção ao tecido conjuntivo formando longas e delgadas e, muitas vezes irregulares, criptas epiteliais (Fig. 2A). As características histológicas foram similares para todos os pacientes. Figura 2B demonstra uma microfotografia do tecido gengival de um dos pacientes do grupo FGH corado pela técnica de picrossirius e análise em microscopia de polarização. Observe a grande quantidade de feixes de fibras colágenas como revelado por áreas birrefringentes.

7.2. Características morfológicas e velocidade de crescimento celular

Fibroblastos gengivais foram observados emergindo de todos os fragmentos de FGH em média após 18 dias, e dos fragmentos de GN após 25 dias. As células de FGH e GN, apesar da diferença de velocidade de crescimento, proliferaram 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. Porém, em condições de confluência celular, os fibroblastos de FGH demonstraram tamanho e largura menores que fibroblastos de GN (Fig. 3). A coloração das células pela técnica convencional de hematoxilina-eosina e análise em microscopia de luz demonstrou que, a redução no volume celular dos fibroblastos de FGH em condições de confluência celular é resultado da redução no volume citoplasmático, e não no volume nuclear (dado não mostrado). Em condições de saturação celular, o número de fibroblastos de GN variou entre $2,5-3,2 \times 10^4$ células/cm², enquanto o número de FGH foi $4,0-4,7 \times 10^4$ células/cm².

Os fibroblastos de FGH apresentaram velocidade de crescimento maior que fibroblastos de GN. Após 30 a 35 dias de cultura primária, mais que 90% do frasco estava preenchido com fibroblastos de FGH, sendo então realizado a primeira subcultura. Por outro lado, a cultura de GN cresceu mais lentamente e a primeira subcultura só foi possível após 42 dias do início do cultivo. Tanto na cultura primária quanto nas subculturas, foi evidente que fibroblastos de FGH proliferaram mais rapidamente que fibroblastos de GN. Após a décima subcultura foi observado uma redução na velocidade de crescimento, e próximo a décima quinta, tanto as células de FGH quanto as de GN, não mais progrediram como inicialmente, sendo então descartadas.

7.3 Análise da proliferação celular

Fibroblastos de GN e FGH foram plaqueados a uma concentração de 25×10^3 células/well em placas de cultura de 24-wells e incubados por 16 h em DMEM/10% soro fetal bovino, seguido por incubação adicional de 16 h em soro fetal bovino a 1%. Um período de incubação em meio de cultura na ausência soro fetal bovino ou a níveis reduzidos é requerido previamente a estimulação celular no objetivo de cessar as vias de ativação da proliferação celular por fatores de crescimento presentes no soro. É demonstrado que períodos superiores a 4 h de ausência da influência de soro fetal bovino são suficientes para reduzir o metabolismo celular a níveis basais com conseqüente inibição da proliferação, sem aparente prejuízo na viabilidade celular (McAllister et al., 1995). A análise proliferativa de fibroblastos provenientes de GN e FGH é mostrada na figura 4. Diferenças na relação de proliferação em todos os períodos analisados foram estatisticamente significantes. Do dia 2 ao 9, as diferenças no número de células entre os grupos foi aproximadamente 63%. No dia 11, foi observado uma saturação no número de células, sendo a proliferação menos intensa.

Técnicas colorimétricas são amplamente utilizadas na análise da proliferação celular (Mirabelli et al., 1985; Oliver et al., 1989). Estas técnicas utilizam a habilidade de células vivas induzirem a formação de um subproduto, freqüentemente através do metabolismo celular, que pode ser detectado por espectrofotometria. Em ensaios de MTT, o sal de MTT é metabolizado nas mitocôndrias celulares resultando na formação do formazan azul. Diferenças quantitativas na densidade óptica do produto metabólico de MTT são demonstradas estarem intimamente relacionadas com a densidade celular. Nossos resultados de absorbância após três dias de crescimento celular para várias concentrações celulares são mostrados na figura 5. Os valores de

absorbância para células derivadas de GN foram 65-92% menores para todas as concentrações celulares.

A distribuição e quantificação de AgNORs e técnicas de imunohistoquímica usando anticorpos monoclonais contra os antígenos PCNA e BrdU são utilizadas como parâmetros para estudos de proliferação celular (Trere et al., 1989; Cabrini et al., 1992; Klim and Yook, 1994; Dorbeare, 1996; Mesquita et al., 1998). NORs são regiões do braço curto dos cinco cromossomos acrocêntricos, cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22, onde os genes para proteínas ribossômicas estão localizados (Howekk, 1977). Os NORs estão associados a proteínas não-histônicas ácidas que são visualizadas através da impregnação por prata. Diversos estudos têm utilizado esta técnica sugerindo que a análise quantitativa e morfométrica de AgNORs são excelentes parâmetros para estimar a atividade proliferativa celular. A técnica de BrdU é baseada na incorporação do análogo a base nitrogenada timina no DNA de células em proliferação. Após a incorporação, o DNA é desnaturado e detectado por ensaios imunohistoquímicos. A proteína PCNA apresenta a função de auxiliar a enzima DNA polimerase delta, e sua função é absolutamente importante durante a replicação do DNA. A produção desta proteína é aumentada em células nas fases S e G₂/M do ciclo celular. Como nos ensaios de BrdU, a detecção imunohistoquímica de PCNA é usada como indicador da atividade proliferativa celular. Os índices de AgNOR, BrdU e PCNA estão listados nas Tabelas 5 e 6. O número médio, a área e o perímetro de AgNORs por núcleo, e os índices de expressão de BrdU e PCNA em fibroblastos de FGH foram significativamente maiores que os do grupo de controle. Figuras 6, 7 e 8 mostram exemplos das técnicas de AgNOR, BrdU e PCNA, respectivamente, em fibroblastos de GN e FGH.

7.4 Análise dos complexos protéicos durante o processo de maturação de cadeias nascentes de colágeno tipo I

Para analisar a expressão e associação de Hsp47 e colágeno tipo I, fibroblastos de GN e FGH foram marcados por 1 h com ³⁵S-metionina, e as proteínas recém-formadas imunoprecipitadas com anticorpos anti-Hsp47. Após separação eletroforética dos imunoprecipitados em gel de poliacrilamida e exposição a filme radiográfico, observou-se que cadeias nascentes de colágeno tipo I co-imunoprecipitam com Hsp47 em linhagens celulares de GN e FGH (Fig. 9). Estes estudos também demonstraram significantes diferenças na produção de colágeno e Hsp47 entre os tipos celulares. Fibroblastos de FGH produziram em média níveis 2 a 3 vezes

maiores de colágeno e Hsp47 que fibroblastos controle. Adicionalmente, foram detectadas outras três principais bandas com massa molecular estimada em 94, 78 e 54 kDa, correspondendo a Grp94, Grp78 e PDI, como revelado por análise de Western blot (Fig. 10). Resultados semelhantes foram observados em fibroblastos 3T6 quando imunoprecipitados com anticorpos anti-Hsp47 (Sauk et al., 1994; Ferreira et al., 1994; Nagata et al., 1988). Em todos os imunoprecipitados, Hsp47 revelou-se como um dublê com peso molecular de 47 e 46 kDa. Provavelmente estas duas isoformas da proteína correspondam a forma madura (47 kDa) e a forma imatura com parciais níveis de glicosilação ou fosforilação. Hsp47 é sintetizada inicialmente com uma massa molecular de 42 kDa, que é reduzido após remoção enzimática do peptídeo sinal e, é então elevado após glicosilação e maturação da molécula (Nagata et al., 1988). Formas imaturas de Hsp47 e outras HSPs foram previamente descritas (Hirayoshi et al., 1991; Sens et al., 1996). Hu et al. (1995) demonstraram que a forma imatura é também capaz de ligar a moléculas de colágeno e gelatina.

No intuito de confirmar a origem das bandas de colágeno foi avaliado a susceptibilidade do imunoprecipitado a degradação por collagenase bacteriana. Estes estudos confirmaram a susceptibilidade e revelaram que a formação dos heterocomplexos, associação de Hsp47, Grp78, Grp94 e PDI, é mediada através de colágeno (Fig. 9, canaletas 7 e 8). Curiosamente, pequenas quantidades de PDI puderam ser detectadas nos imunoprecipitados de GN e FGH mesmo após degradação enzimática.

Hsp47 é a única glicoproteína com função de *chaperone* descrita até o momento com especificidade a um substrato, colágeno. Outra característica importante que difere Hsp47 de outras proteínas *chaperones* é a ligação a gelatina Sepharose 4B. Saga et al. (1987) e outros (Shroff et al., 1993; Ferreira et al., 1994) demonstraram que Hsp47 associa *in vitro* a *beads* de gelatina Sepharose mesmo na presença de altas concentrações de sal, e que a dissociação ocorre apenas em condições de acidez do tampão de eluição para níveis inferiores a pH 6.3. Após marcação metabólica das células com ³⁵S-metionina, proteínas foram extraídas e misturadas com gelatina Sepharore 4B por 5 h. Análise autorradiográfica produziu resultados similares ao da imunoprecipitação usando anticorpos anti-Hsp47. Em ambos os tipos celulares foi observado a ligação de diferentes quantidades de colágeno, Grp94, Grp78, PDI e Hsp47 (Fig. 11).

Idênticos estudos de imunoprecipitação foram realizados em células de FGH e GN marcadas com ³⁵S-metionina utilizando anticorpos anti-colágeno tipo I. Estes estudos reproduziram os resultados obtidos com anticorpos anti-Hsp47 revelando

que Hsp47 tão bem quanto Grp94, Grp78 e PDI são co-imunoprecipitados por anticorpos anti-colágeno tipo I (Fig. 12). Estes estudos também confirmaram que fibroblastos de FGH produzem maiores quantidades de colágeno que células normais. A análise densitométrica do gel mostrou que a produção de colágeno por fibroblastos de FGH foi em média 1,8 vezes maior que em fibroblastos de GN.

A seguir, nós realizamos ensaios de imunoprecipitação utilizando extratos de FGH e GN marcados com ^{35}S -metionina e anticorpos anti-Grp78 ou anti-Grp94 (Fig. 13 e 14). Para ambos os anticorpos, Hsp47 e colágeno foram detectados nos imunoprecipitados.

7.5. Análise da expressão e produção de Hsp47 e colágeno

As distribuições de Hsp47 e colágeno tipo I foram investigadas em fibroblastos de GN e FGH através de ensaios de imunofluorescência e microscopia confocal. Fibroblastos demonstraram uma forte positividade para Hsp47 nas regiões do RE. As células também demonstraram uma distribuição microvesicular através do citoplasma, o qual correlaciona com os compartimentos intermediários justapostos entre o RE e o complexo de Golgi. A expressão de colágeno tipo I foi observada no citoplasma celular correspondendo a regiões do RE, complexo de Golgi e vesículas secretoras (Fig 15). Não foram observados diferenças significativas na expressão entre os tipos celulares e nem distribuição no núcleo ou superfície celular. Recentemente, Morino et al. (1997) e Hebert et al. (1999) demonstraram a expressão de Hsp47 na superfície celular de células neoplásicas. Nas células de FGH, apesar da semelhança proliferativa com células neoplásicas, a expressão de Hsp47 foi restrita ao citoplasma celular. Dupla marcação para Hsp47 e cadeias $\alpha 1(\text{I})$ e visualização por microscopia confocal demonstraram a colocalização das proteínas nas regiões do RE e compartimentos intermediários (Fig. 16).

A análise da produção de colágeno total por fibroblastos de GN e FGH é mostrada na figura 17. A síntese de colágeno foi determinada pela capacidade de incorporação e metabolismo de ^3H -prolina. Fibroblastos de FGH produziram aproximadamente 32% mais colágeno total que fibroblastos controle. Estes dados foram confirmados por eletroforese interrompida de colágeno isolado de fibroblastos de GN e FGH (Fig. 18). O principal colágeno produzido por ambas as células foi o do tipo I. A relação das cadeias $\alpha 1(\text{I})$ para $\alpha 2(\text{I})$ foi 2:1, como esperado para colágeno tipo I normal, enquanto que a produção de colágeno tipo III foi muito fraca para todos os tipos celulares.

A produção de Hsp47 foi analisada em maiores detalhes pela técnica de Western blot revelada por quimioluminescência (Fig. 19A). Esta técnica demonstrou diferenças significativas na produção de Hsp47. Todas as linhagens celulares de FGH produziram maiores quantidades de Hsp47 quando comparado com fibroblastos de GN. A análise densitométrica do gel demonstrou que o aumento médio na expressão foi 3,7 vezes maior em fibroblastos de FGH (Fig. 19B).

A expressão gênica de Hsp47 foi analisada no intuito de determinar se a produção de Hsp47 é controlada a níveis transcricionais. Para este objetivo foi realizado a técnica de RT-PCR utilizando primers para o exon 4 do gene Hsp47. Estes primers produzem um produto de 98 pares de base. Após separação eletroforética dos produtos do PCR e exposição do gel a filme radiográfico, observou maiores níveis de Hsp47 mRNA em fibroblastos de FGH quando comparados com fibroblastos de GN (Fig. 20A). β -actina, uma proteína presente em níveis constantes em quase todos os tipos celulares (*housekeeping*), foi utilizada como controle da reação. Análise densitométrica foi realizada comparando as bandas de FGH e GN levando em consideração a intensidade da banda de β -actina. Foi considerado 1 ponto o valor da densidade óptica das bandas de β -actina para cada respectivo tipo celular (Fig. 20B).

Análise de citometria de fluxo revelou uniforme diploidia celular para as células de GN e FGH. Fibroblastos de GN mostraram pequena fração celular nas fases S ($19,8\% \pm 1,1$) e G₂/M ($5,8\% \pm 0,8$) do ciclo celular e uma grande população celular na fase G₁ ($74\% \pm 5,7$). Em contraste, todas as linhagens celulares de FGH revelaram grande população celular nas fases S ($40,9\% \pm 7,3$) e G₂/M ($10,1\% \pm 3,2$) e pequena fração na fase G₁ ($40,9\% \pm 8,5$). A seguir, analisamos a expressão de Hsp47 em relação as fases do ciclo celular. Estes estudos demonstraram que Hsp47, em ambos os tipos celulares, é expressa em 100% das células nas fases G₁/0 do ciclo celular, e é relativamente pouco expressa durante as fases S e G₂/M. A porcentagem de fibroblastos de GN na fase S do ciclo celular que expressaram Hsp47 foi $7,8\% \pm 2,3$ e na fase G₂/M de $4,3\% \pm 1,8$. Para fibroblastos de FGH, a porcentagem foi de $6,2\% \pm 3,1$ para a fase S e $2,3\% \pm 0,7$ para a fase G₂/M.

A indução de Hsp47 após elevação da temperatura e tratamento com diferentes inibidores da síntese de colágeno são mostrados na figura 21. Estes inibidores são caracterizados por bloquear especificamente a síntese de colágeno durante os eventos de processamento, maturação ou secreção das moléculas (Nagata, 1996). A resposta de produção de Hsp47 em fibroblastos de GN e FGH foi praticamente similar após a aplicação de seis diferentes condições de estresse.

Estes fatores foram de equivalente toxicidade. Em todas as condições, exceto com cicloxamida, foi observado um aumento significativo na produção de Hsp47.

7.6. Efeito de NP1 na produção de colágeno e Hsp47

Pró-peptídeos correspondendo a regiões N-terminal das cadeias $\alpha 1$ do colágeno tipo I revelaram grande afinidade a Hsp47 (Paglia et al., 1979; Wu et al., 1986; Hu et al., 1995), e demonstraram ser importantes para os eventos de translação e translocação de colágeno através do RE (Sauk et al., 1994; Satoh et al., 1996).

A adição de NP1 em culturas celulares de FGH produziu uma significativa diminuição na produção de Hsp47 e colágeno tipo I (Fig. 22). De fato, a análise densitométrica revelou uma redução de 46% na produção de Hsp47 e de 23% na síntese de colágeno após o tratamento com NP1. Visto que Hsp47 foi demonstrado interagir com NP1 durante os eventos de translação, NP1-GST foi adicionado diretamente ao meio de cultura na concentração de 10, 20 e 40 nM e, proteínas recém-formadas imunoprecipitadas utilizando anticorpos que reconhecem a porção GST. Estes estudos revelaram que Hsp47 é imunoprecipitado em associação a NP1-GST (Fig. 23). Embora análise por microscopia confocal tenha revelado a colocalização de Hsp47 e colágeno no RE e compartimentos intermediários, NP1 adicionado aos fibroblastos foram, após 24 h de incubação, localizados principalmente no citoplasma e núcleo, com pequena porção sendo localizada no RE e compartimentos intermediários (Fig. 24).

7.7. Produção de citocinas por fibroblastos de GN e FGH

A produção de IL-6 e TGF- $\beta 1$ é mostrada nas figuras 25 e 26 respectivamente. Todas as linhagens celulares de fibroblastos de FGH produziram níveis significativamente maiores de IL-6 e TGF- $\beta 1$ ($p < 0,013$ e $p < 0,0035$ entre grupos, respectivamente). IL- $\beta 1$ e TNF- α se presentes, foram produzidos a níveis inferiores aos detectados por nossos ensaios. A sensibilidade para IL- 1β foi de 1,5 $\mu\text{g/ml}$ e para TNF- α de 3,9 $\mu\text{g/ml}$.

7.8. Expressão de MMPs e TIMPs

Para examinar a possível participação de MMPs e seus inibidores teciduais na patogênese do aumento gengival observado em pacientes com FGH, nós analisamos os níveis de expressão e produção das duas principais enzimas do grupo das MMPs e dos dois principais inibidores teciduais sintetizados por fibroblastos. A expressão dos quatro genes foi aumentada em fibroblastos de GN quando comparado com fibroblastos de FGH (Fig. 27). Análise densitométrica dos produtos de PCR após normalização através da densidade óptica das bandas de β -actina demonstrou uma redução média na expressão de 31% para MMP-1, 38% para MMP-2, 12% para TIMP-1 e 7% para TIMP-2 em fibroblastos de FGH em relação a GN.

Quando fibroblastos de GN e FGH foram cultivados em meio de cultura na ausência de soro fetal bovino e os sobrenadantes celulares analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo gelatina como substrato, enzimas com atividade gelatinolítica de peso molecular de aproximadamente a 98, 70 e 46 kDa foram detectadas (Fig. 28). Elas correspondem a forma latente de MMP-9 e as formas ativas de MMP-2 e MMP-1, respectivamente (Bikerdal-Hansen, 1993; Fukuda et al., 1998). Em todas as linhagens de GN a produção de MMP-1 e MMP-2, as principais enzimas do grupo das MMPs sintetizada por fibroblastos, foi aumentada quando comparada com linhagens de FGH. A produção de MMP-9, nas condições de nossos ensaios, foi principalmente detectada nas linhagens celulares de GN.

Baseado nos resultados da determinação da produção de TGF- β 1 por fibroblastos de FGH e em resultados previamente descritos (Imbert et al., 1998; Dafacque et al., 1999), que demonstraram que 5 mg/ml de anticorpos anti-TGF- β 1 (B & D Systems) são efetivos na neutralização de 500 mg de TGF- β 1, nós encontramos que 10 mg/ml de anti-TGF- β 1 é uma ótima dose para neutralizar TGF- β 1 produzida por 1×10^6 fibroblastos de FGH3 em 24 h. O tratamento com estes anticorpos em diferentes doses promoveu uma diminuição na expressão gênica de MMP-2 e uma ligeira estimulação na expressão de MMP-1. MMP-1 e MMP-2 apresentaram uma alteração progressiva na expressão em paralelo com o aumento na neutralização de TGF- β 1. Nestas condições, a expressão de TIMP-1 e TIMP-2 não foi alterada (Fig. 29). A diminuição na expressão de MMP-2 e a ligeira estimulação na expressão de MMP-1 foram confirmadas por ensaios zimográficos (Fig. 30).

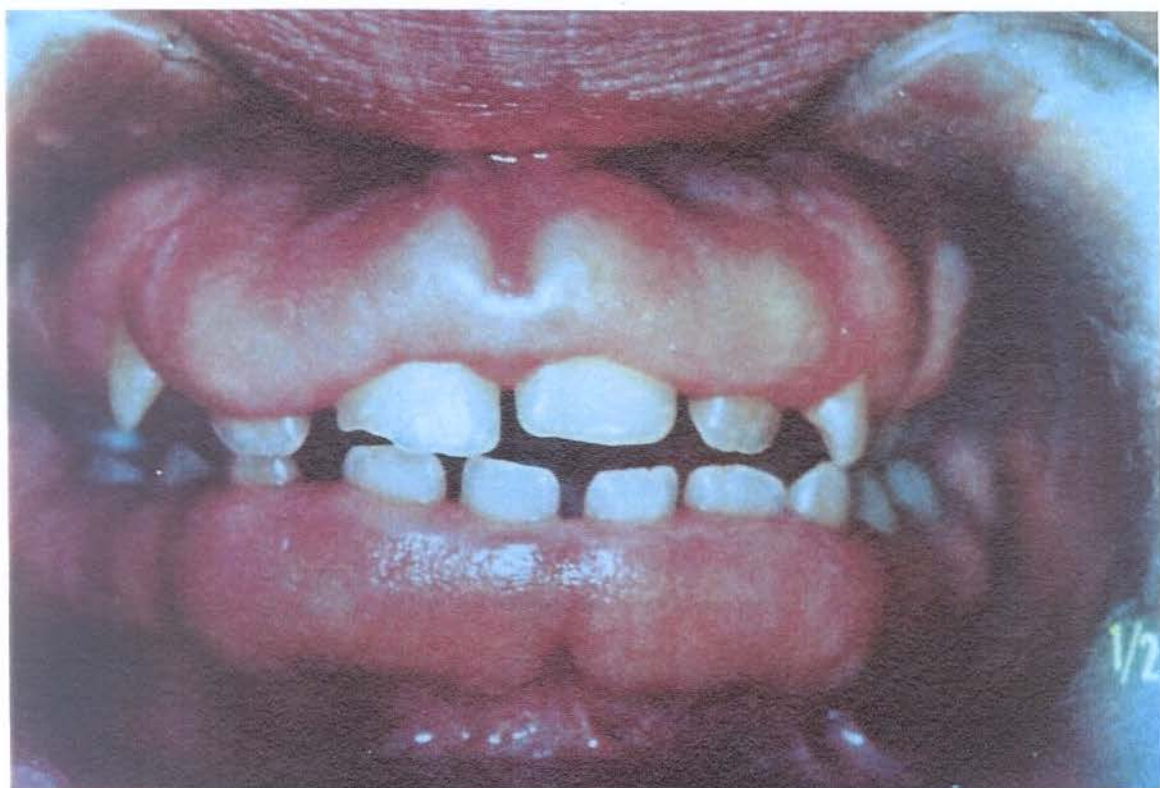


Fig. 1. Foto clínica de um dos pacientes com FGH deste estudo. Note a severa e generalizada hiperplasia gengival envolvendo todos os dentes de ambos os maxilares. Os dentes foram morfológicamente normais e não foram observadas quaisquer alterações radiográficas.

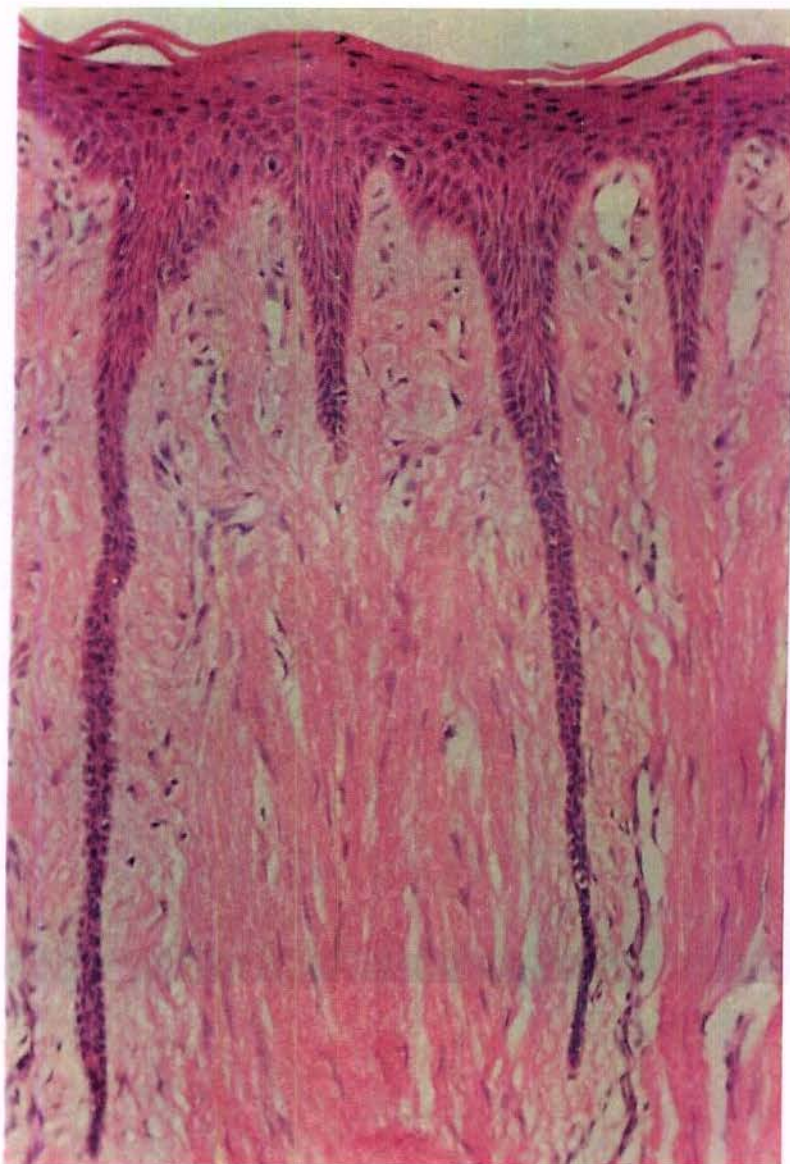


Fig. 2A. Fotomicrografia da gengiva obtida após gengivectomia/gengivoplastia do paciente da figura 1. A hiperplasia gengival é proveniente de um acentuado aumento no número de feixes de fibras colágenas do tecido conjuntivo. O epitélio apresentou hiperplasia e profundas e delgadas criptas epiteliais projetam em direção ao conjuntivo. (H.E., x250)



Fig. 2B. Tecido gengival de um dos pacientes do grupo FGH corado pela técnica de picrosirius e análise por microscopia de polarização. Regiões de birrefringência correspondem a feixes de fibras colágenas. (x250)

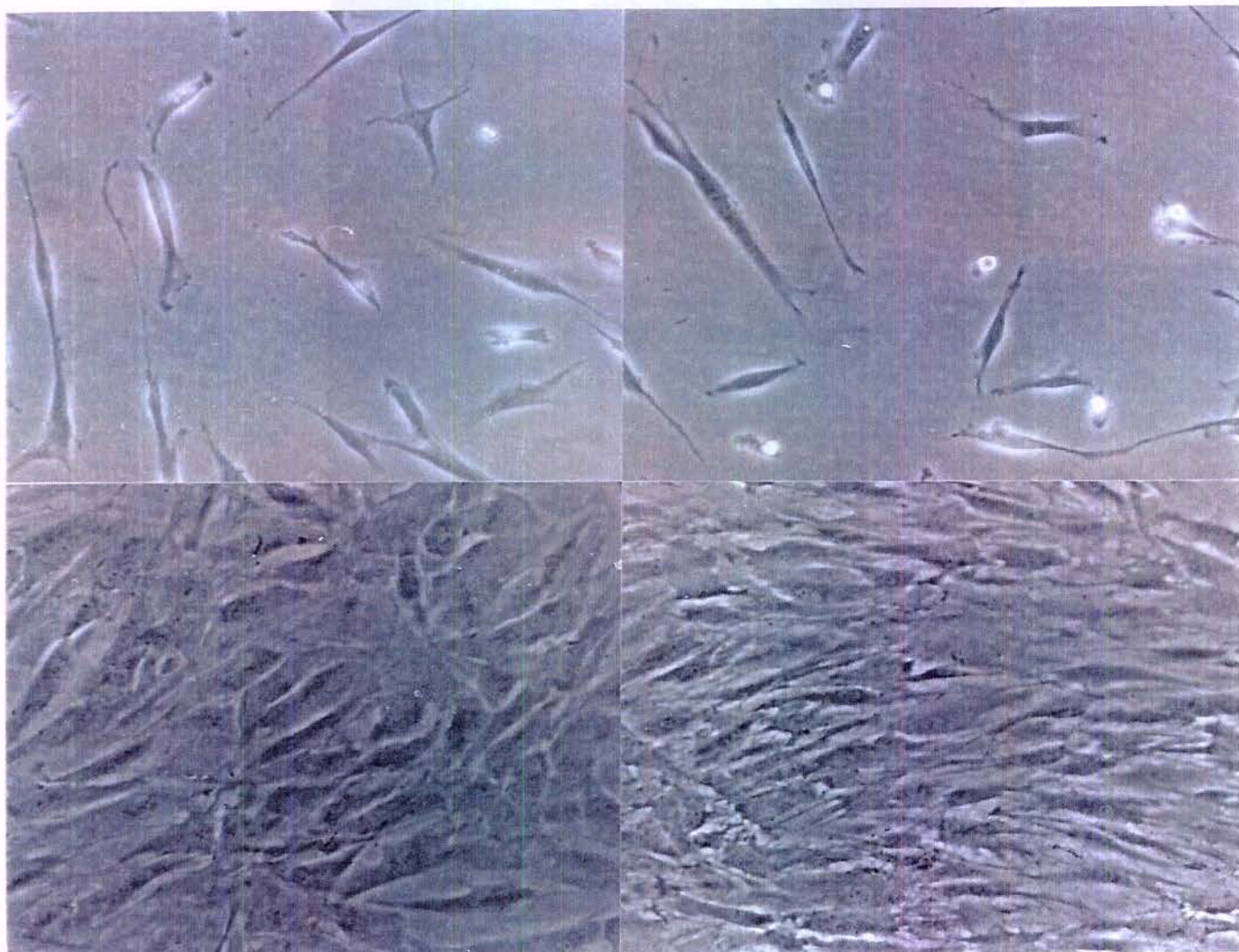


Fig. 3. Características morfológicas dos fibroblastos de GN (à esquerda) e de FGH (à direita). Note o típico formato fusiforme de ambas as células em condições de subconfluência celular. Em condições de confluência celular, fibroblastos de GN demonstraram dimensões maiores que fibroblastos de FGH. Painel superior - fibroblastos em condições de subconfluência celular. Painel inferior - células em confluência. (x160)

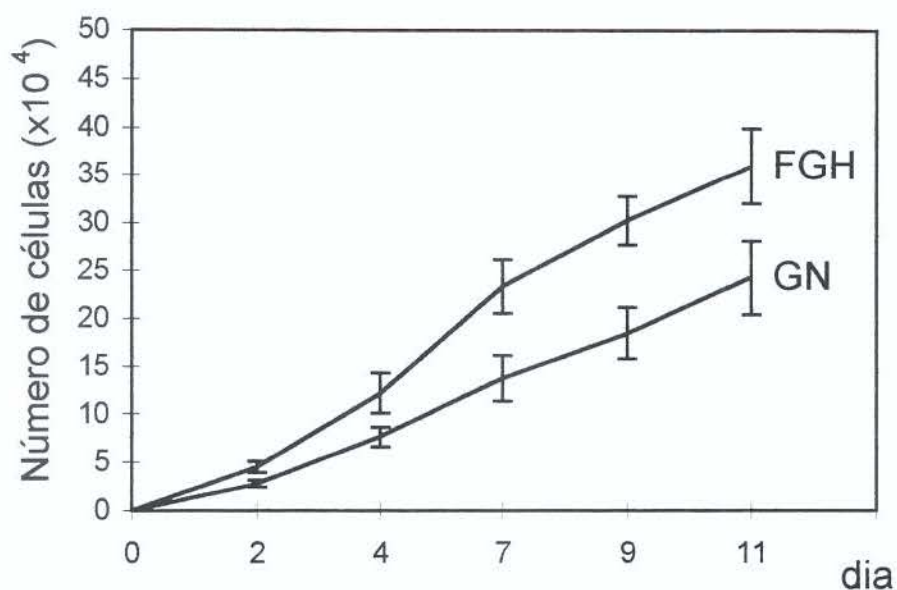


Fig. 4. Relação de crescimento celular para fibroblastos de GN e FGH. Cada ponto representa a média de 16 contagens independentes para quatro linhagens celulares de GN e quatro linhagens de FGH. Apartir do dia 2 ao 9, as diferenças no número de células em culturas de fibroblastos de FGH foi sempre maior que culturas de células normais. As diferenças foram estatisticamente significantes para todos os períodos analisados. ($p < 0,05$)

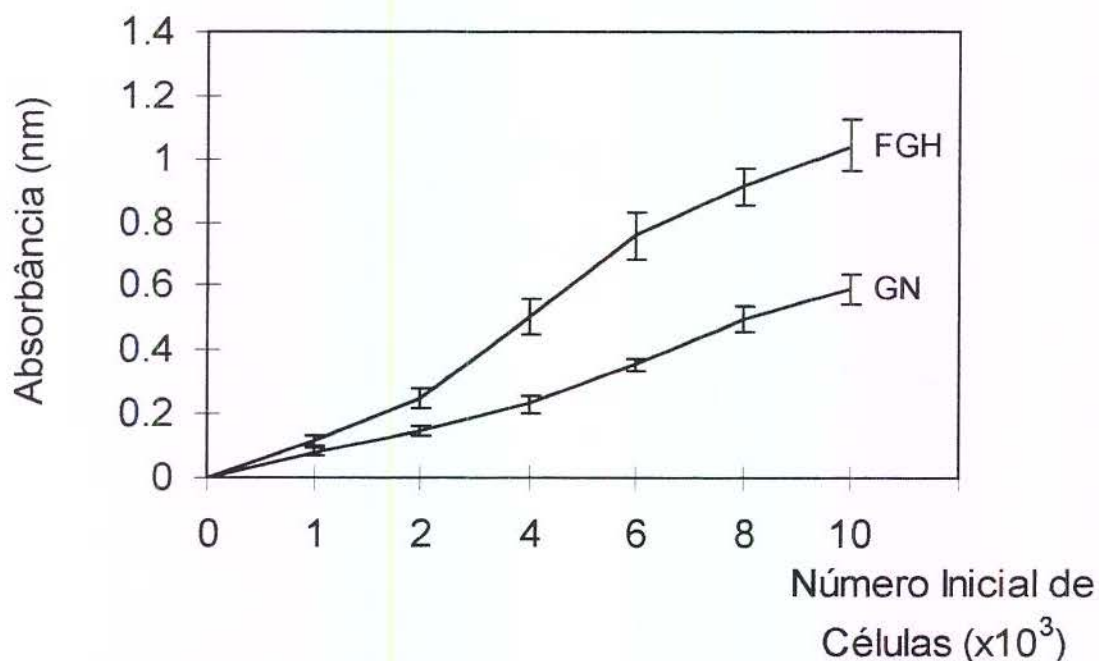


Fig. 5 Absorbância do produto do metabolismo do sal de MTT como indicador de proliferação celular em diversas concentrações celulares. Os valores de absorbância representam a média de 5 reações independentes de quatro linhagens celulares de GN e quatro de FGH. Reações realizadas em triplicata. Absorbância para o grupo de células de FGH foi 65-92% maior para todas as concentrações celulares. ($p < 0,05$)

Tabela 5. Análise quantitativa e morfométrica de AgNORs em linhagens celulares de GN e FGH. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 500 células (5 lâminas independentes) de 4 linhagens celulares de cada grupo.

	Número	Área (μm)	Perímetro (μm)
GN	1,64 $\pm$ 1,1	1,53 $\pm$ 1,15	3,01 $\pm$ 1,88
FGH	2,26 $\pm$ 1,69*	2,21 $\pm$ 1,69*	3,49 $\pm$ 2,07

*Valores são estatisticamente significantes a nível de $p < 0,05$ como determinado por Teste de Student.

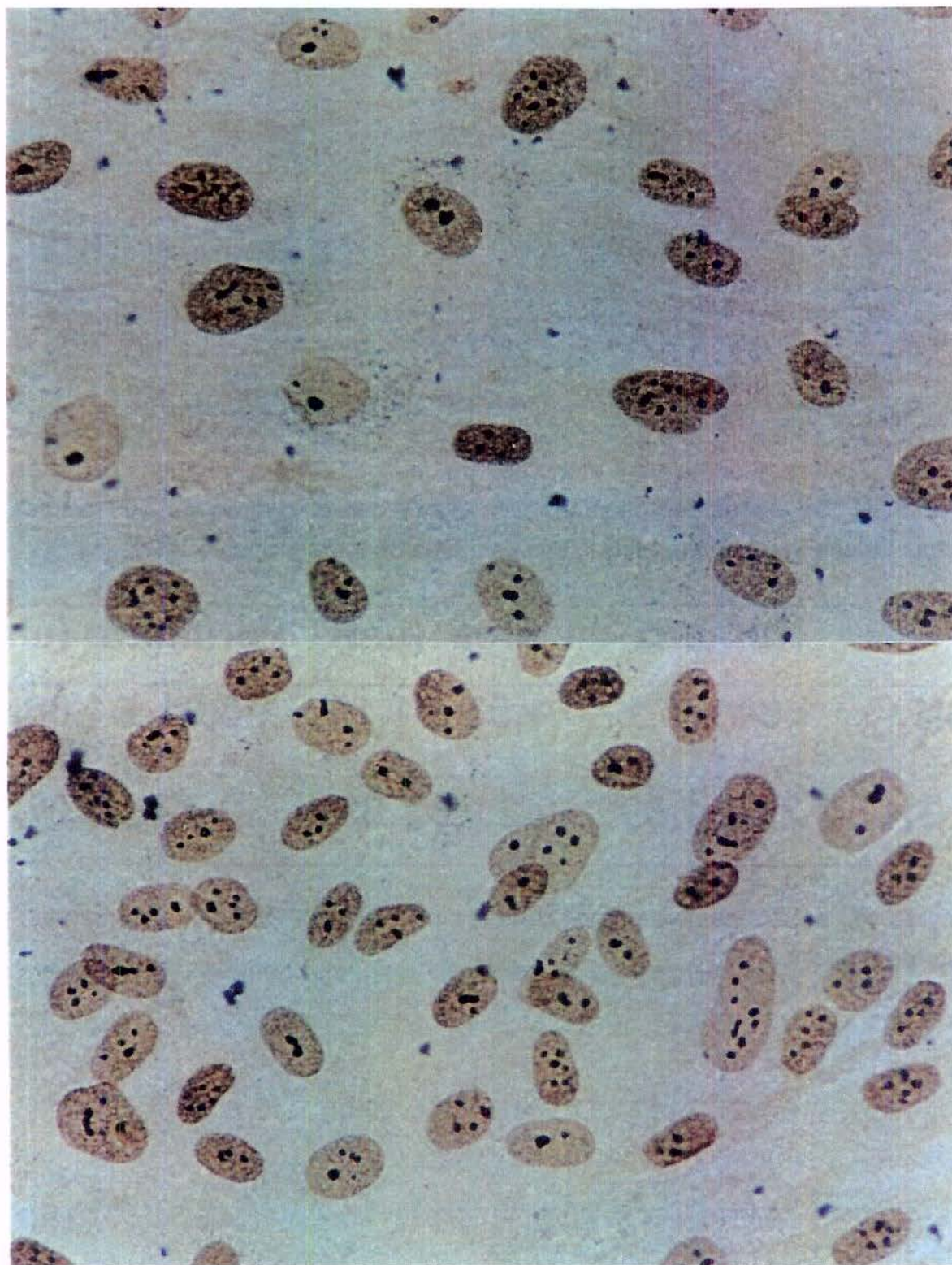


Fig. 6 Fotomicrografia de uma das linhagens celulares de GN (superior) e uma de FGH (inferior) corada pela técnica de AgNOR. Em fibroblastos de GN a ocorrência foi de 1 a 2 NORs/núcleo, enquanto que para fibroblastos de FGH a ocorrência foi de 2 a 3 NORs/núcleo. A área e o diâmetro dos NORs foram também maiores em fibroblastos de FGH. Em ambos os tipos celulares, o formato foi bastante regular, característica de células não transformadas. (x400)

Tabela 6. Incorporação de BrdU e expressão de PCNA em fibroblastos de GN e FGH. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão de 4 linhagens celulares para cada grupo analisado.

	GN	FGH
BrdU (%)	20,2 $\pm$ 5,1	35,6 $\pm$ 6*
PCNA (%)	16,8 $\pm$ 3,6	35 $\pm$ 3,4*

*Diferenças significantes como determinado por teste de Student ($p < 0.05$).

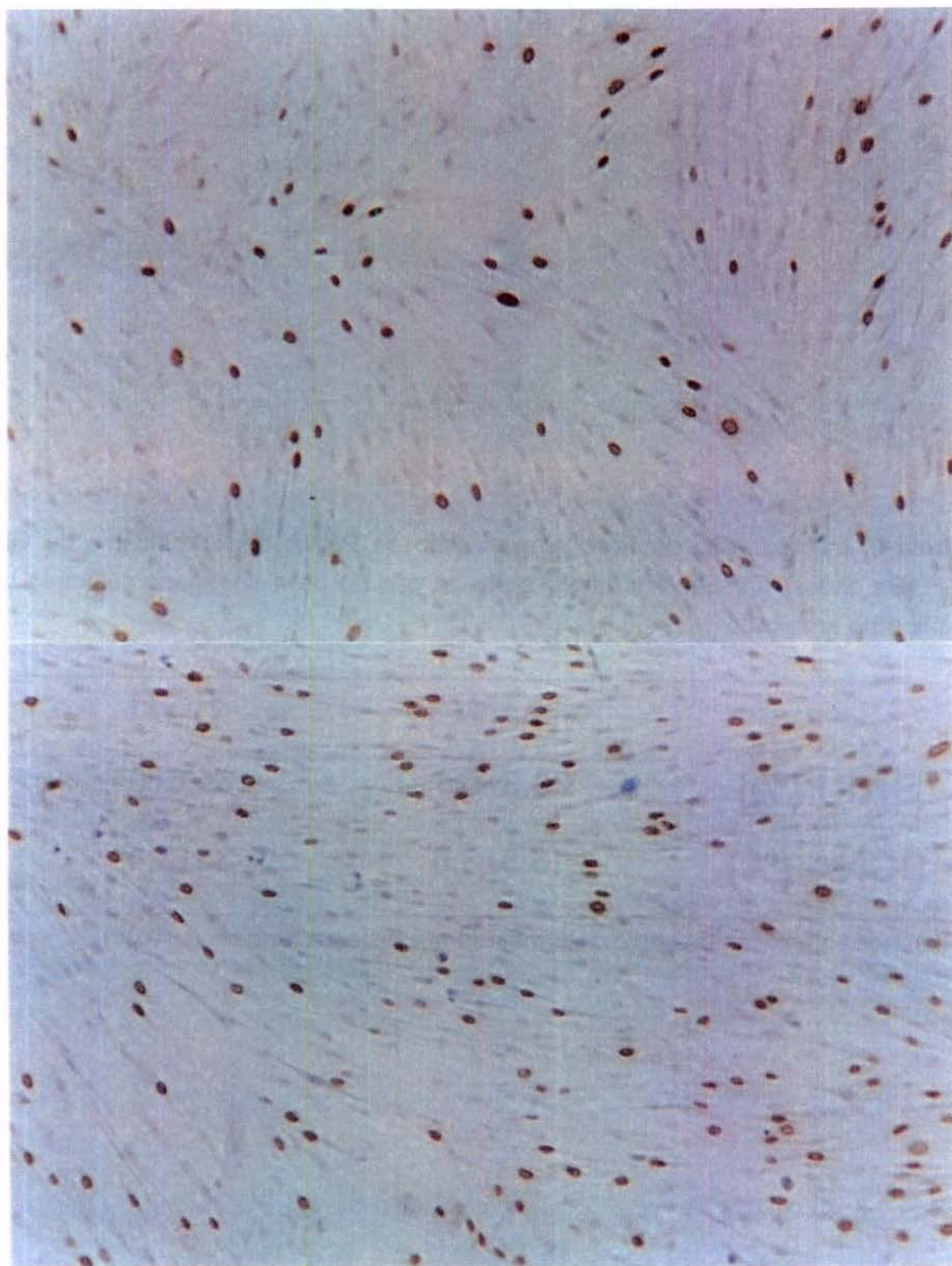


Fig. 7 Análise imunohistoquímica da incorporação de BrdU em células normais (superior) e em células provenientes de pacientes com FGH (inferior). Após incorporação, o DNA foi desnaturado e o antígeno detectado pela técnica de biotina-estreptavidina-peroxidase. Observe o maior número de células positivas em fibroblastos de FGH. (x400)

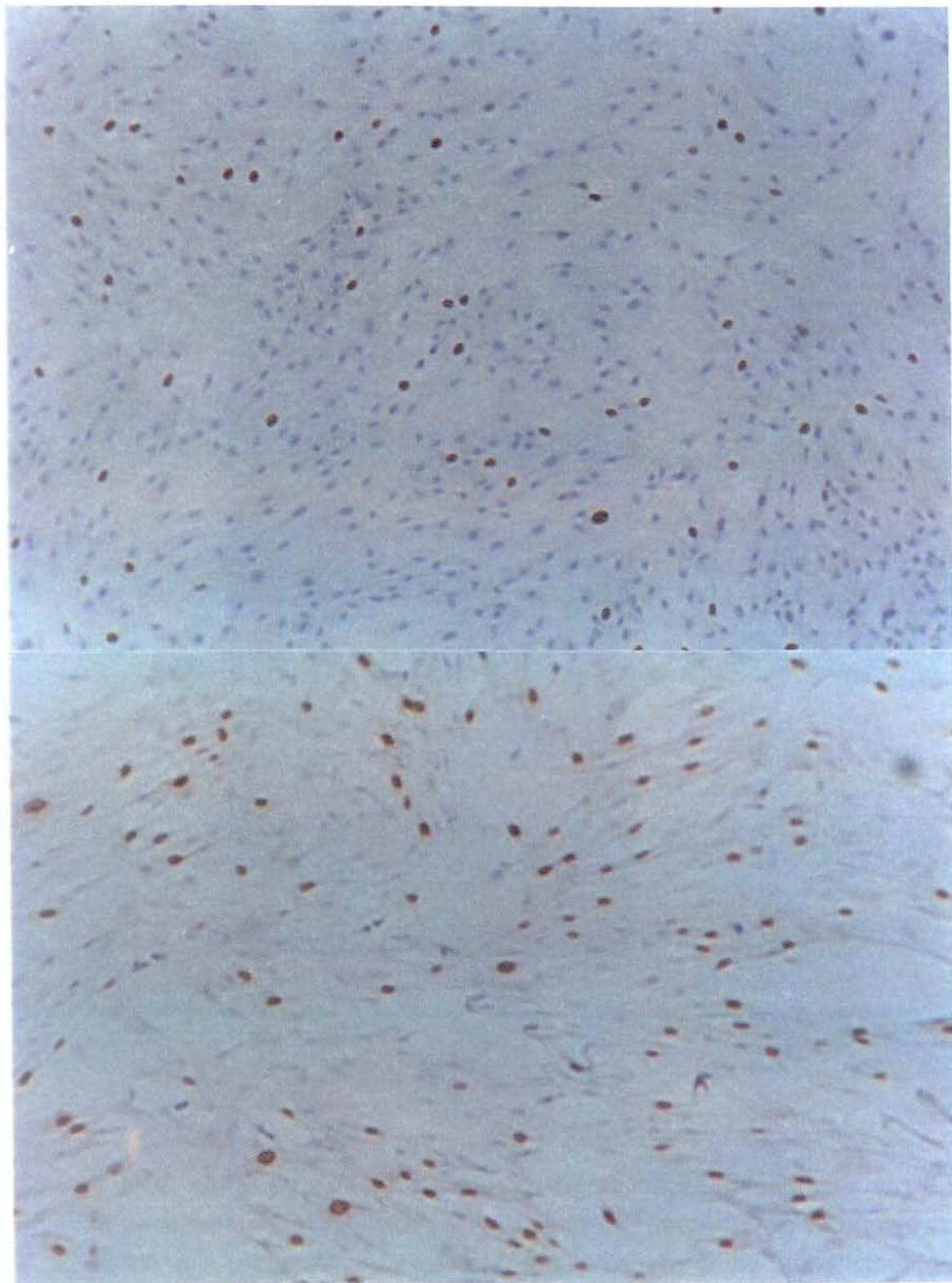


Fig. 8 Análise imunohistoquímica de PCNA em fibroblastos de GN (superior) e FGH (inferior) mostrando células positivas com núcleo marcado. Compare a maior incidência de células positivas em culturas celulares de FGH. (x400)

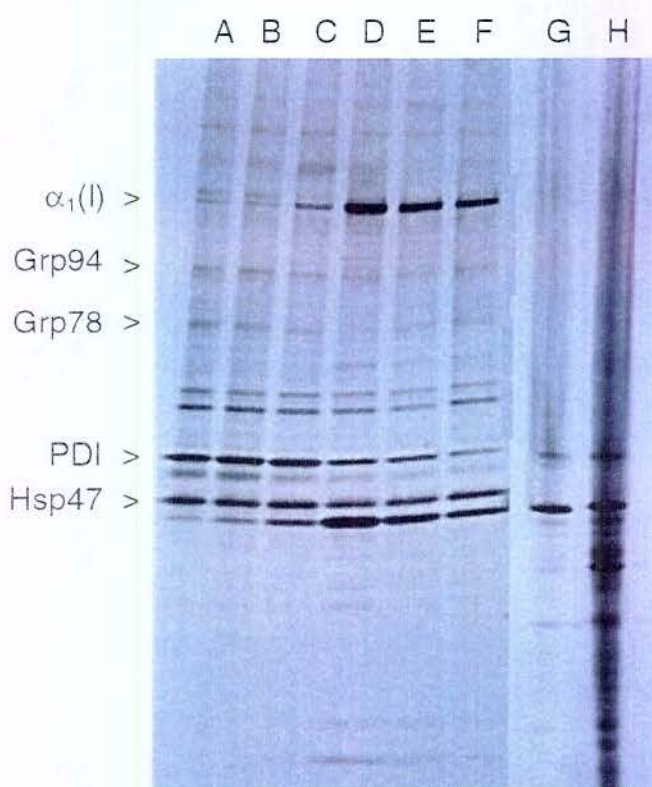


Fig. 9 (A). Imunoprecipitação de Hsp47 em fibroblastos de GN e FGH. As células foram marcadas por 1h com ^{35}S -metionina e proteínas recém-formadas extraídas e imunoprecipitadas como descrito em Materiais e Métodos. Canaletas A e B correspondem a GN1 e GN3, e canaletas C, D, E e F correspondem a FGH2, FGH3, FGH5 e FGH7, respectivamente. A posição das cadeias $\alpha_1(I)$, Grp94, Grp78, PDI e Hsp47 são indicadas como revelado por Western blot. Canaletas G e H indicam ensaio de digestão com collagenase. Para este estudo, proteínas imunoprecipitadas com anticorpos anti-Hsp47 foram incubadas com 2.7 U de collagenase bacteriana e mantidas por 30 min à 37° C. Canaleta G corresponde a GN1 e canaleta H corresponde a FGH3.

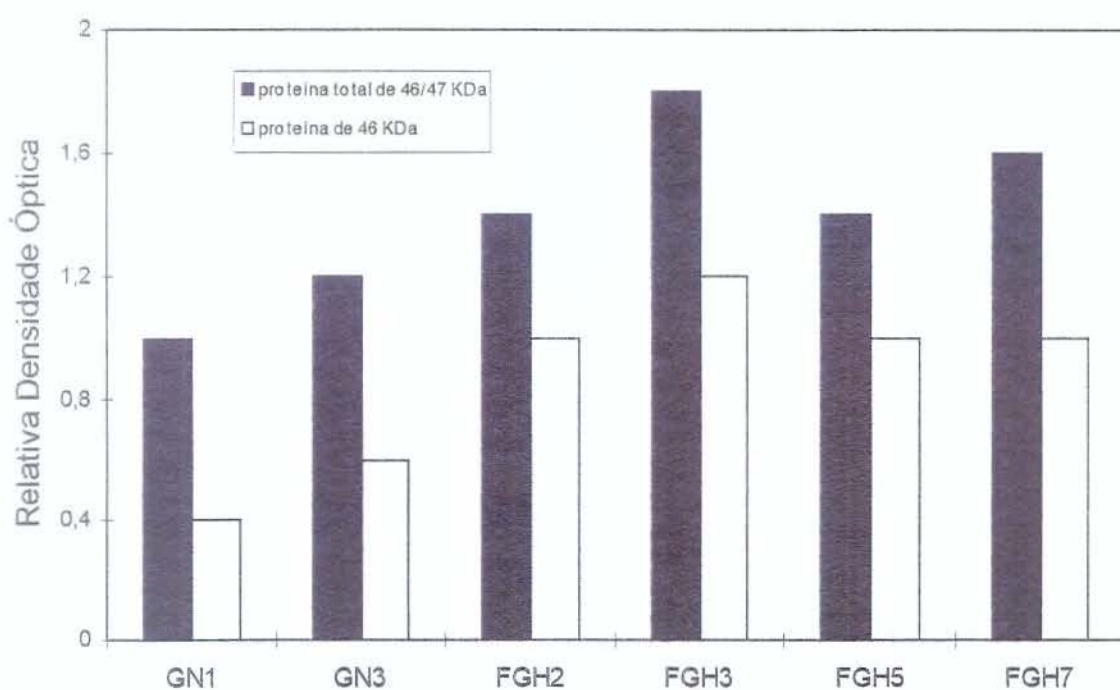


Fig. 9 (B). Análise densitométrica comparando a produção das isoformas de 46 e 46/47 kDa de Hsp47 em fibroblastos de GN e FGH. Observe que a produção de Hsp47 foi maior para todas as linhagens celulares de FGH.

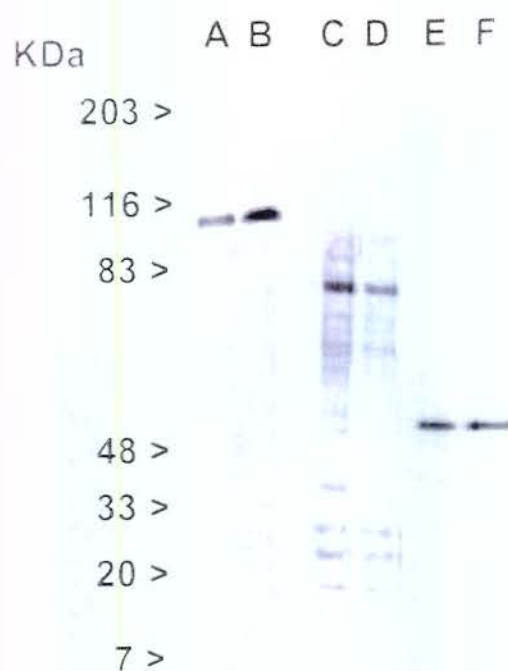


Fig. 10. Análise da produção protéica de Grp94, Grp78 e PDI através da técnica de Western blot. Canaletas A e B correspondem a reações utilizando anticorpos anti-Grp94, canaletas C e D reações para Grp78 e canaletas E e F reações para PDI. Canaletas A, C e E representam GN1 e canaletas B, D e F a FGH3.

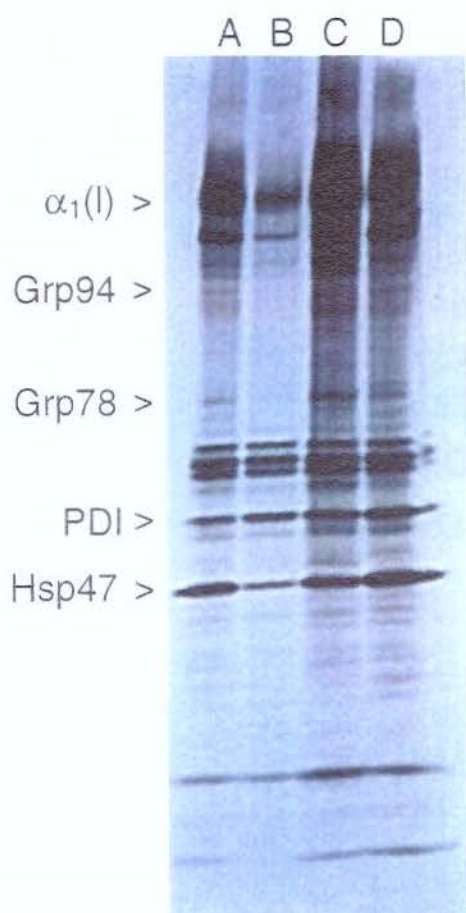


Fig. 11. Ensaio de ligação de Hsp47 à gelatina Sepharose 4B. Os extratos celulares marcados com ^{35}S -metionina foram incubados com gelatina Sepharose 4B como descrito por Nakai et al. (1988). Canaletas A e B correspondem a GN1 e GN3 e canaletas C e D a FGH3 e FGH5. Cadeias $\alpha_1(I)$, Grp94, Grp78, PDI e Hsp47 são indicadas.

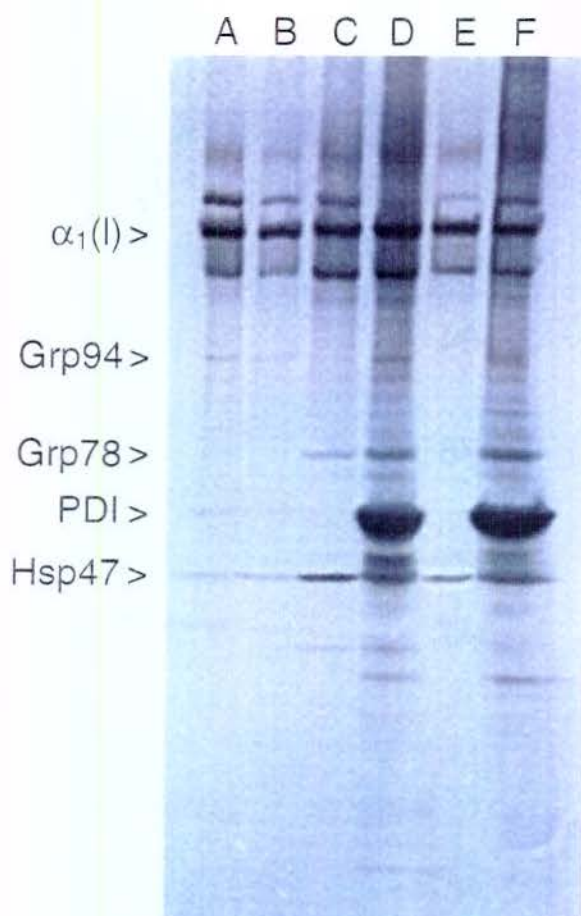


Fig. 12. Co-imunoprecipitação de Hsp47 com colágeno. Fibroblastos de GN e FGH foram marcados por 1h com ^{35}S -metionina e após lise celular, alíquotas do extrato celular foram misturadas com anticorpos anti-colágeno tipo I. Os imunocomplexos foram precipitados pela adição de proteína-A-Sepharose. Canaletas A e B representam GN1 e GN3 e canaletas C, D, E e F representam FGH2, FGH3, FGH5 e FGH7 respectivamente. As posições das cadeias $\alpha_1(\text{I})$, Grp94, Grp78, PDI e Hsp47 são indicadas.

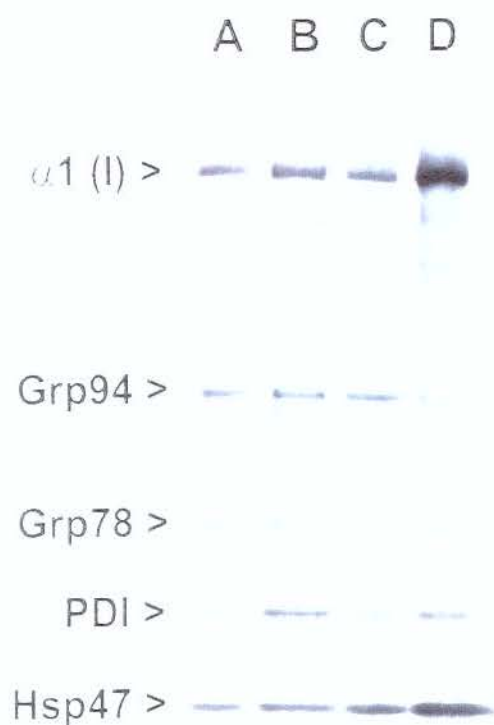


Fig. 13. Ensaio de imunoprecipitação utilizando anticorpos anti-Grp94. Imunoprecipitação de GN1 e GN3 representam os canaletas A e B, enquanto que os de FGH3 e FGH5 são os canaletas C e D respectivamente. A posição de $\alpha 1$ (I), Grp94, Grp78, PDI e Hsp47 são indicadas.

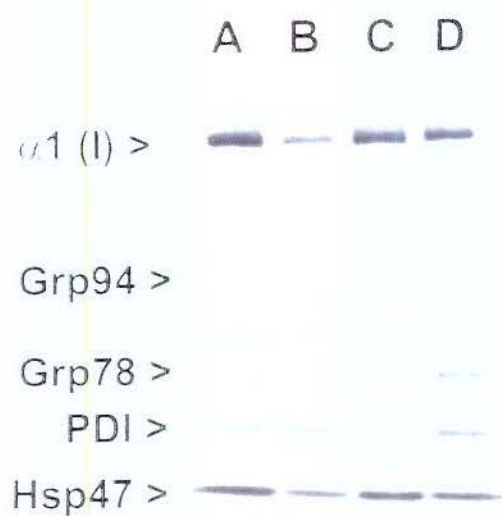


Fig. 14. Imunoprecipitação de colágeno e Hsp47 utilizando anticorpos anti-Grp78. A distribuição dos canaletas é a mesma da figura 13. A posição de $\alpha 1(I)$, Grp94, Grp78, PDI e Hsp47 são indicadas.

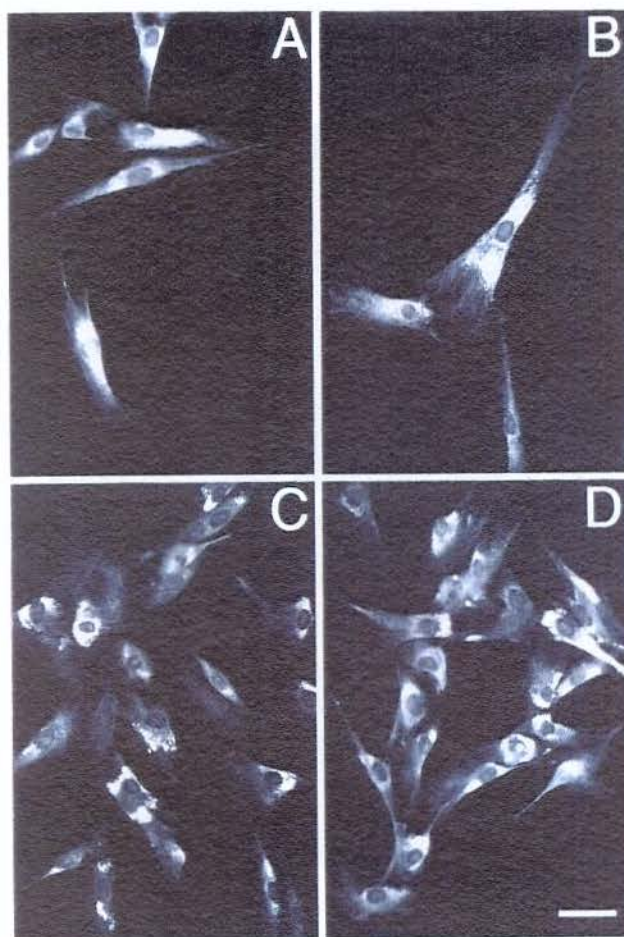


Fig. 15. Distribuição celular de Hsp47 e colágeno tipo I em fibroblastos de GN e FGH. Células marcadas com anticorpos anti-colágeno tipo I estão localizadas no painel superior, enquanto que células marcadas com anti-Hsp47 estão localizadas no painel inferior. Figuras A e C representam GN1 e figuras B e D representam FGH3. Intensa positividade para colágeno tipo I é uniformemente distribuída pelo citoplasma celular. Localização de Hsp47 é observada nas regiões correspondendo aos compartimentos do RE. Barra, 5 mm.

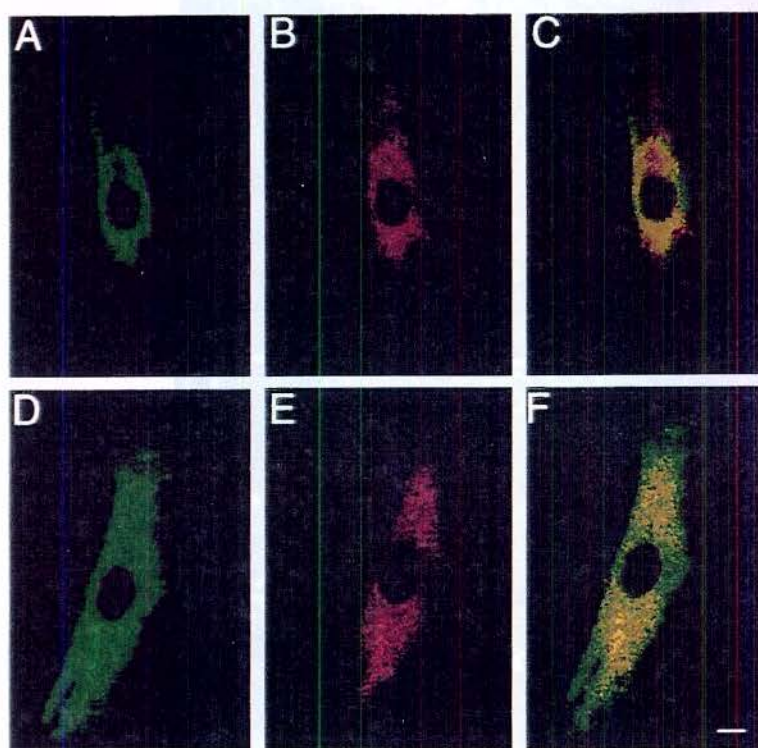


Fig. 16. Colocalização de Hsp47 e colágeno tipo I em fibroblastos de GN (painel superior) e FGH (painel inferior). As células foram fixadas, permeabilizadas e coradas usando anticorpos anti-Hsp47 (vermelho) e anticorpos anti-colágeno tipo I (verde). Regiões em amarelo representam áreas de sobreposição de imagens. Barra, 5 mm.

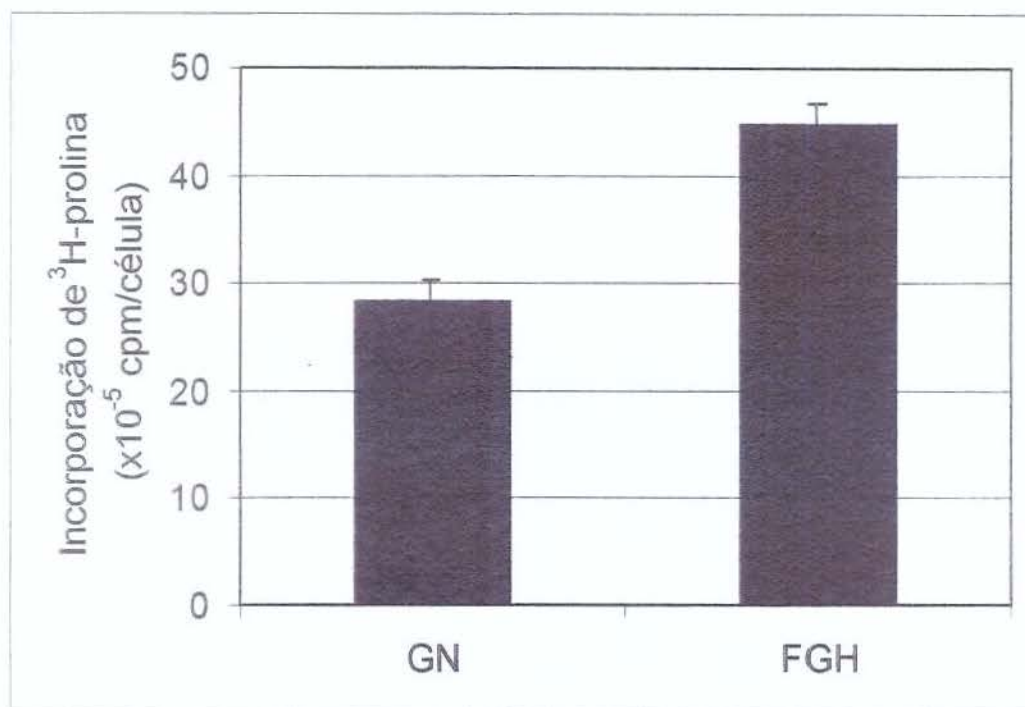


Fig. 17. Determinação da produção de colágeno em fibroblastos de GN e FGH como revelado pela incorporação de ^3H -prolina. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão dos grupos de dois experimentos independentes. Teste de Student foi utilizado para análise estatística entre os grupos. A produção de colágeno por fibroblastos de FGH foi significativamente maior do que nas células normais. ($p < 0,01$)

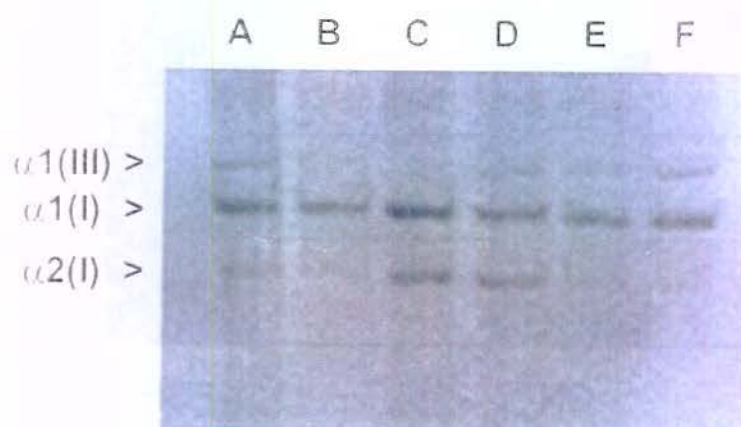


Fig. 18. Análise por eletroforese interrompida do colágeno total marcado com ^3H -prolina produzido por fibroblastos de GN e FGH. Note a relação estequiométrica normal das cadeias $\alpha 1(\text{I})$ e $\alpha 2(\text{I})$ de 2:1. As cadeias $\alpha 1(\text{III})$ foram fracamente detectadas nestes ensaios. Canaletas A e B correspondem a NG1 e NG3 e canaletas C, D, E e F a FGH2, FGH3, FGH5 e FGH7 respectivamente.

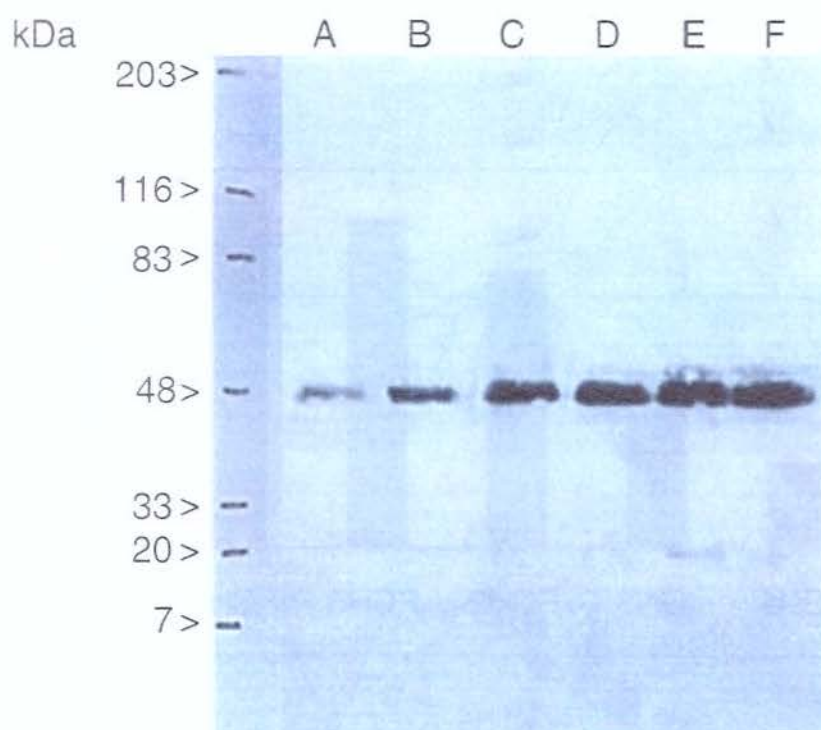


Fig. 19 (A). Análise da produção protéica de Hsp47 por Western blot em fibroblastos de GN e fibroblastos de FGH. Cada amostra representa equivalente quantidade de proteína total como determinado por ensaios colorimétricos. Distribuição dos canaletas como na figura 18.

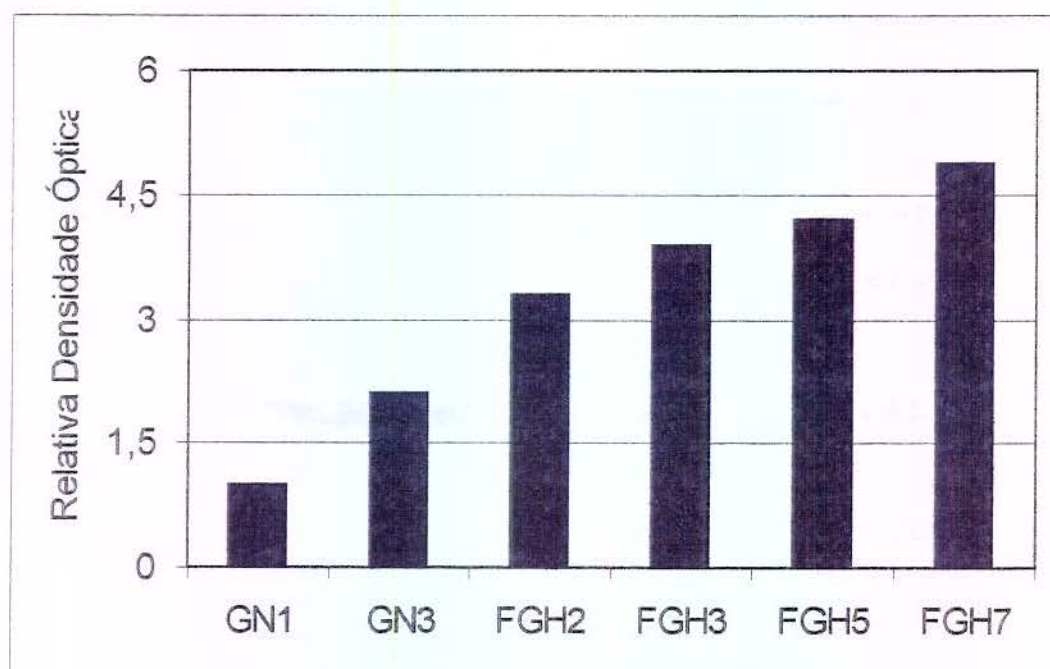


Fig. 19 (B). Análise desintométrica da produção de Hsp47 por fibroblastos de GN e FGH. Fibroblastos de FGH produzem aproximadamente 3,7 vezes mais Hsp47 que fibroblastos de GN.

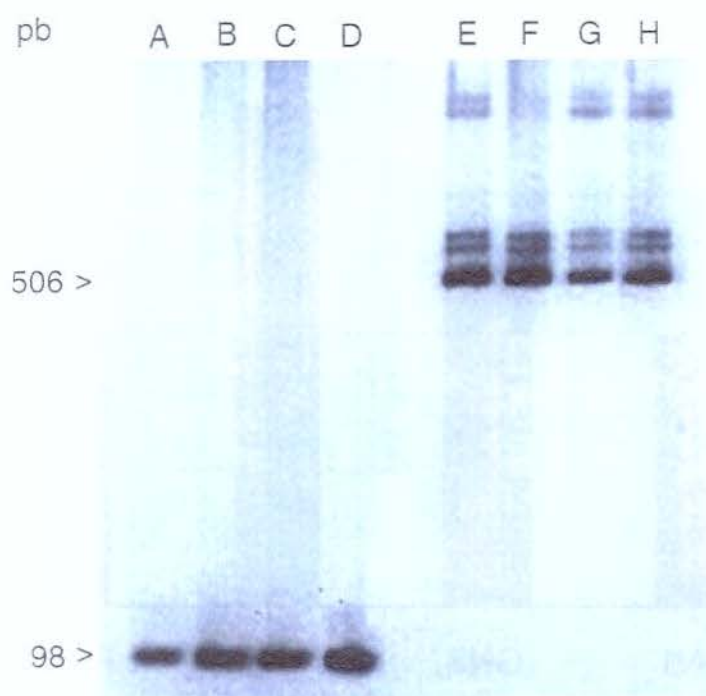


Fig. 20 (A). Expressão de Hsp47 em fibroblastos de GN e FGH como revelado pela técnica de RT-PCR. RNA total foi isolado das culturas celulares e cDNA sintetizado por RT. Após amplificação utilizando primers específicos para o exon 4 de Hsp47, os produtos foram separados eletroforéticamente em gel de poliacrilamida. Canaletas A a D representam produtos da reação de PCR para Hsp47, e canaletas E a H representam reação de PCR para β -actina. Canaletas A e E são GN1, canaletas B e F são GN3, canaletas C e G são FGH3 e canaletas D e H são FGH5.

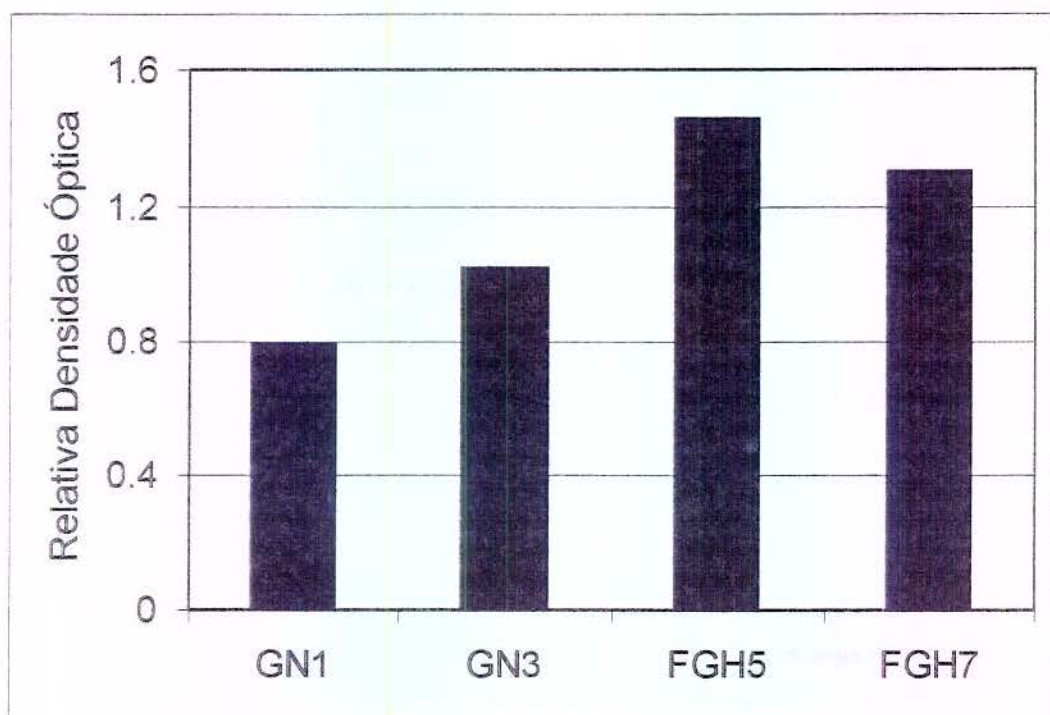


Fig. 20 (B). Comparação da expressão de Hsp47 por fibroblastos de GN e FGH. A expressão de Hsp47 foi aproximadamente 1,6 vezes maior em fibroblastos de FGH. Valores são expressos como densidade óptica para níveis específicos de mRNA. As leituras ópticas foram normalizadas por equivalência da quantidade de β -actina RNA.

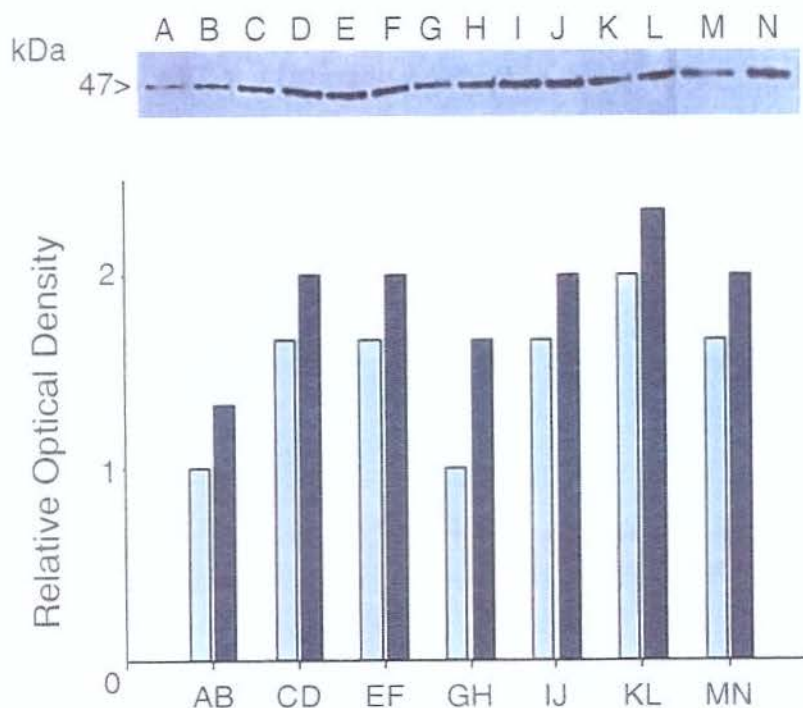


Fig. 21. Efeito de estímulos térmicos e inibidores da síntese de colágeno na produção de Hsp47 por fibroblastos de GN e FGH. As células foram cultivadas em DMEM acrescido por um dos seguintes inibidores: α , α' -dipiridil (canaletas C e D), brefeldina A (canaletas E e F), cicloxamida (canaletas G e H), cálcio ionofore A23187 (canaletas I e J), monensina (canaletas K e L). Canaletas M e N representam células estimuladas por choque térmico e, canaletas A e B a condições normais de cultivo. Seguindo o tratamento, as células foram lisadas e o extrato celular analisado por Western blot utilizando anticorpos anti-Hsp47. Os dados representam a média da densidade óptica de dois experimentos independentes. Canaletas A, C, E, G, I, K e M correspondem a GN1 e canaletas B, D, F, H, J, L e N a FGH3.

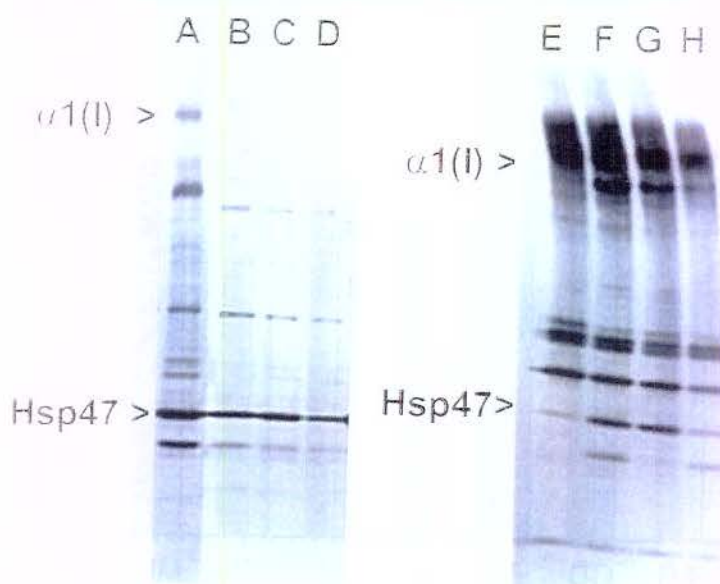


Fig. 22 (A). Efeito de NP1 na síntese de colágeno e Hsp47. Uma linhagem celular de FGH (FGH3) foi incubada por 24 h com NP1 adicionado diretamente ao meio de cultura nas concentrações de 10, 20 e 40 nM. Após marcação com ^{35}S -metionina, os extratos celulares foram imunoprecipitados utilizando anticorpos anti-Hsp47 (à esquerda) e anti-colágeno tipo I (à direita). Canaletas A e E representam condições normais de cultivo, B e F são 10 nM NP1, C e G são 20 nM NP1 e D e H são 40 nM NP1. A posição das cadeias $\alpha 1(I)$ e Hsp47 são indicadas.

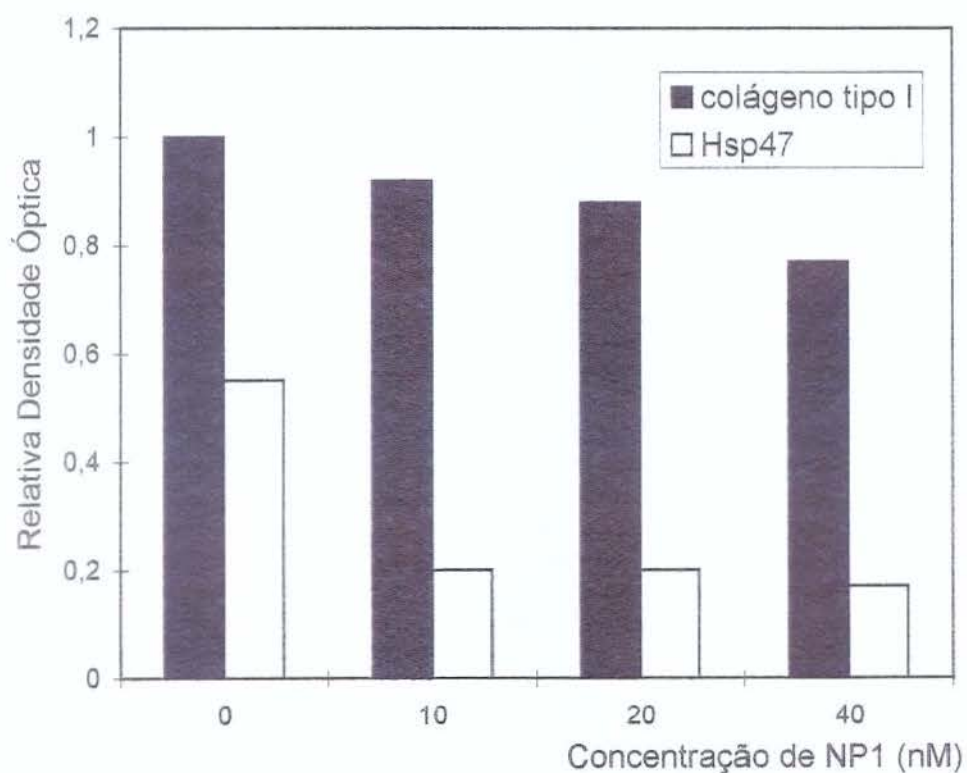


Fig. 22 (B) Densidade óptica relativa do efeito inibitório de NP1 na produção de Hsp47 e colágeno tipo I. Observe a redução nos níveis tanto de colágeno como Hsp47 após 24 h de cultivo na presença de NP1.

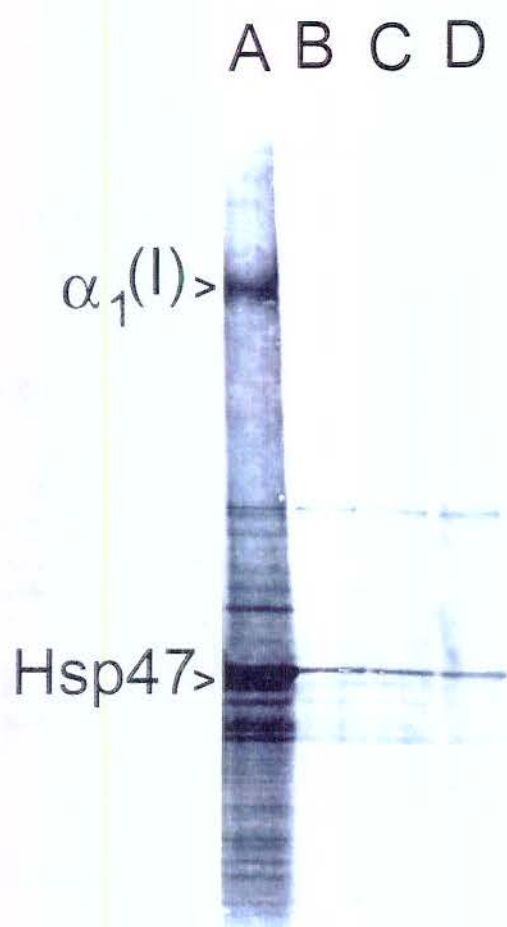


Fig. 23. Imunoprecipitação de Hsp47 com anticorpos anti-GST. Fibroblastos (HGF3) foram incubados por 24 h com NP1-GST na concentração de 10, 20 e 40 nM seguidos por imunoprecipitação utilizando anticorpos anti-Hsp47 (canaleta A) ou anticorpos anti-GST (canaletas B a D). As posições de $\alpha_1(I)$ e Hsp47 são indicadas.



Fig. 24. Localização de Hsp47 e NP1-GST. Fibroblastos (HGF3) foram incubados por 24 h com 40 nM NP1-GST, fixados, permeabilizados e incubados com anticorpos anti-Hsp47 (A) e anti-GST (B). Áreas em amarelo indicam a colocalização de Hsp47 e NP1 como revelado por microscopia confocal (C). Barra, 5 mm.

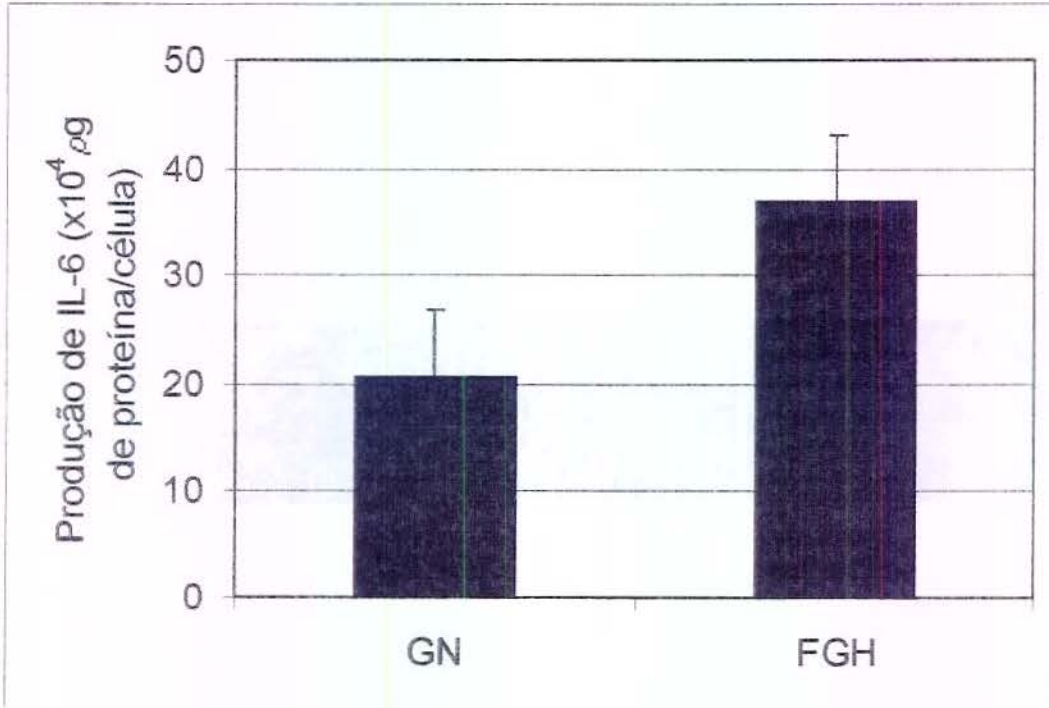


Fig. 25. Produção de IL-6 por fibroblastos de GN e FGH. A concentração de IL-6 no sobrenadante de cultura celular foi determinado por ELISA de captura utilizando anticorpos anti-IL-6. Os resultados são expressos em ng IL-6/célula. A produção de IL-6 por fibroblastos de FGH foi significante maior. ($p < 0,013$).

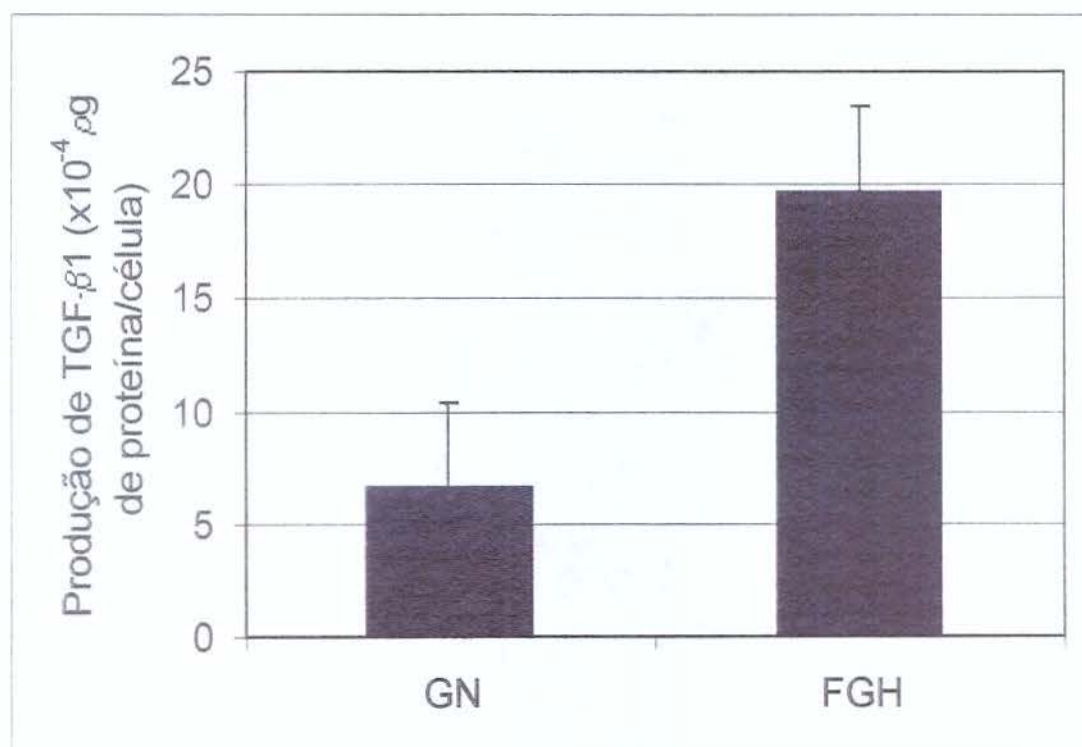


Fig. 26. Produção de TGF-β1 por fibroblastos de GN e FGH. TGF-β1 em sobrenadante de cultura foi rapidamente exposto a HCl para ativação, seguido por ELISA de captura utilizando anticorpos anti-TGF-β1. Os resultados são expressos em ng TGF-β1/célula. ($p < 0,0035$)

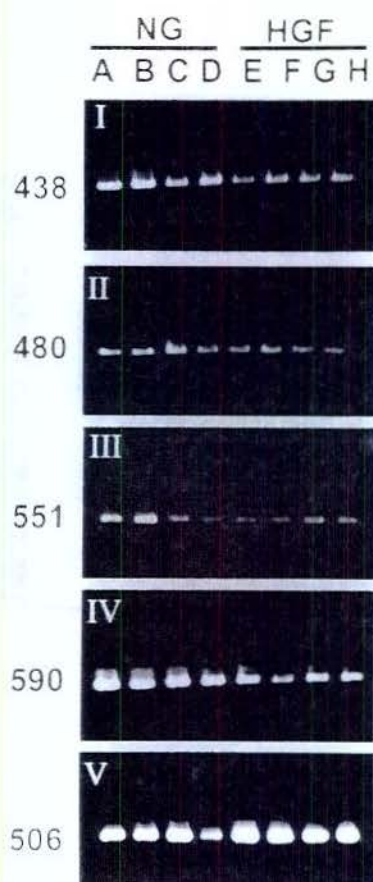


Fig. 27. Análise da expressão gênica de MMP-1 (painel I), MMP-2 (painel II), TIMP-1 (painel III) e TIMP-2 (painel IV) em fibroblastos de GN e FGH. Canaletas A a D representam GN1, GN3, GN4 e GN5 e canaletas E a H a FGH2, FGH3, FGH5 e FGH7 respectivamente. Painel V corresponde a expressão de β -actina. Análise densitométrica foi realizada considerando um ponto de unidade óptica o valor de β -actina para cada respectiva amostra. Este estudo demonstrou que a expressão gênica de MMP-1, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 foi aproximadamente 31%, 38%, 12% e 7%, respectivamente, menor em fibroblastos de FGH.

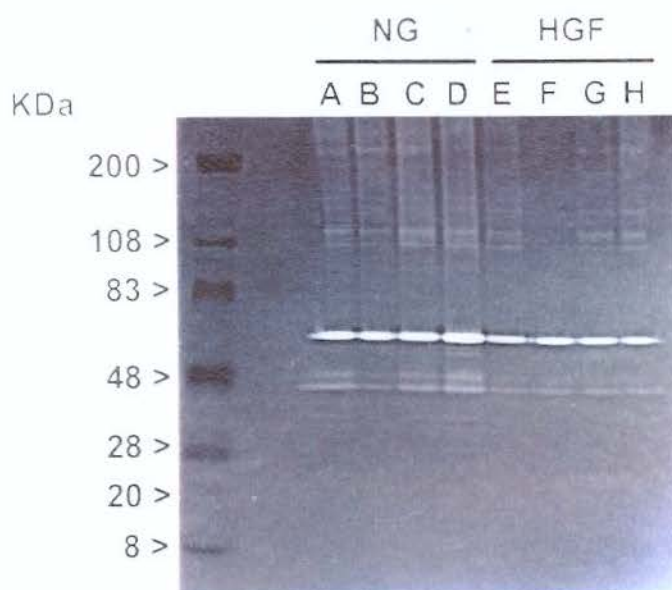


Fig. 28. Análise zimográfica em gel de poliacrilamida co-polimerizado com gelatina, do sobrenadante de cultura celular de fibroblastos de GN e FGH. Canaletas são distribuídos como na figura 27. Observe a presença de três enzimas com atividade gelatinolítica de massa molecular estimada em 98, 70 e 46 kDa nos sobrenadantes de GN, correspondendo a forma inativa de MMP-9 e as formas ativas de MMP-2 e MMP-1, respectivamente. Por outro lado, em sobrenadantes de FGH foi detectado apenas as formas de MMP-1 e MMP-2.

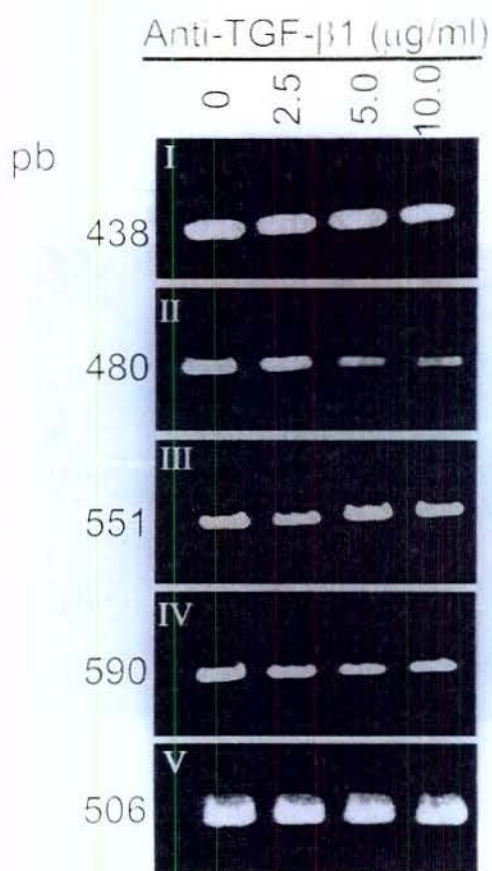


Fig. 29. Efeito da neutralização de TGF- β 1 na expressão gênica de MMP-1 (painel I), MMP-2 (painel II), TIMP-1 (painel III) e TIMP-2 (painel IV). Painel V representa reações para β -actina. Fibroblastos foram incubados com anticorpos neutralizantes por 24 h e, a expressão gênica analisada por RT-PCR. Observe a redução progressiva nos níveis de MMP-2 e a ligeira estimulação de MMP-1 em paralelo com a redução nos níveis de TGF- β 1. A expressão de TIMPs não foi alterada após neutralização de TGF- β 1. As canaletas 0; 2,3; 5,0 e 10,0 indicam a concentração de anticorpos.

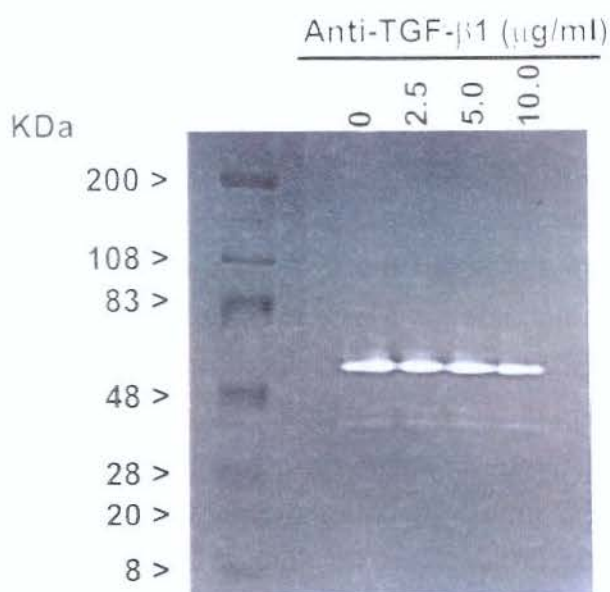


Fig. 30. Análise zimográfica sobre efeito de anticorpos neutralizantes. Os sobrenadantes das culturas celulares descritos na figura 29 foram submetidos a análise eletroforética contendo gelatina como substrato. Após incubação do gel em tampão de ativação e coloração por Coomassie blue, pode-se observar uma redução na produção de MMP-2, enquanto que a produção de MMP-1 aparentemente foi discretamente elevada. Canaletas são indicados como concentração de anticorpos.

8. DISCUSSÃO

Hiperplasia gengival generalizada pode estar associada com o uso de drogas como fenitoína, ciclosporina e nifedipina (Marshall and Bartold, 1998); ou associada a condições inflamatórias e tumorais (Regezi and Sciubba, 1999) ou pode ainda ser transmitida de forma hereditária, como componente ou não de uma síndrome (Gorlin et al., 1990). No grupo estudado, a hiperplasia gengival generalizada foi transmitida de forma autossômica dominante (Bozzo et al., 1994) e nenhum dos indivíduos apresentou qualquer alteração comumente descrita em associação a fibromatose gengival.

Estão bem estabelecidos na literatura as características clínicas e histológicas da FGH, mas os mecanismos biológicos envolvidos no aumento gengival são ainda pobremente entendidos. O aumento na quantidade de tecido conjuntivo observado na FGH pode ser reflexo de um aumento na proliferação celular, aumento na síntese de colágeno e outras macromoléculas da MEC, devido a um desequilíbrio na relação síntese-degradação de MEC resultado da diminuição na atividade degradatória, ou ainda devido a uma desregulação na produção de proteínas que controlam estes eventos, principalmente citocinas. Embora alguns autores tenham documentado um aumento na síntese de MEC incluindo colágeno, fibronectina e glicosaminoglicanos e, um aumento nos níveis de proliferação celular em fibroblastos de FGH (Shirasuna et al., 1989; Tipton et al., 1997), os mecanismos bioquímicos envolvidos nesta doença continuam incertos. Para avaliar o possível papel destes fatores na etiologia da FGH, o presente estudo isolou e caracterizou quatro linhagens celulares de fibroblastos de indivíduos de uma mesma família afetada por FGH e comparou a atividade destas células em relação a proliferação celular, síntese de Hsp47 e outras proteínas *chaperones*, síntese de colágeno, produção de citocinas TGF- β 1, IL-1 β , IL-6 e TNF- α e expressão de MMPs e seus inibidores teciduais com fibroblastos de gengivas clinicamente normais.

Existem poucos estudos na literatura avaliando o comportamento proliferativo e a produção de colágeno por fibroblastos isolados de pacientes com FGH, e os resultados variam. Johnson et al. (1986) foram os primeiros a isolar e caracterizar os fibroblastos de uma menina com hiperplasia gengival generalizada associada a hipertricose, macroglossia e alterações faciais. Os fibroblastos isolados por Johnson et al. demonstraram alterações nucleares de tamanho e vida celular em cultura curta, além de proliferarem mais lentamente quando comparados com células de GN. A quantidade de proteína total sintetizada por estas células foi a mesma que nas

células normais, mas a quantidade de colágeno foi apenas a metade da produzida por células controle. Shirasuna et al. (1989) também isolaram e caracterizaram fibroblastos de dois irmãos afetados com FGH generalizada. A relação de proliferação celular nas duas linhagens de fibroblastos foi menor que a relação obtida por células controles. Por outro lado, a síntese de proteína total, colágeno e glicosaminoglicanos foi maior em fibroblastos de FGH. Oikarinen et al. (1989) estudando um caso de FGH associada a deficiência em hormônios do crescimento, descreveram uma baixa taxa proliferativa e uma menor produção de mRNA para colágenos tipos I e III. Tipton et al. (1997) obtiveram resultados diferentes aos previamente descritos, ao descreverem uma velocidade de crescimento maior em fibroblastos de FGH. Estes autores também analisaram a síntese de colágeno tipo I e fibronectina, sendo que os resultados indicam que fibroblastos de FGH produzem significativamente mais colágeno tipo I e fibronectina que fibroblastos derivados de GN.

Nossos resultados de proliferação celular e síntese de colágeno foram similares aos publicados por Tipton et al. (1997). Fibroblastos de FGH apresentaram através de cinco ensaios diferentes de análise de proliferação celular (ensaio de crescimento celular, ensaio colorimétrico de MTT, contagem e medida de regiões organizadoras nucleares, determinação da expressão de PCNA e incorporação de BrdU) uma maior taxa de proliferação celular. Análises por citometria de fluxo confirmaram estes resultados demonstrando que embora os fibroblastos de GN e FGH são diplóides, fibroblastos de FGH mostraram uma maior porcentagem de células nas fases S e G₂/M do ciclo celular. Esta é uma relação não usual que tem geralmente sido descrita em processos proliferativos agressivos como pseudossarcomas (Ro et al.; 1993; Oshiro et al., 1994). Estas células também foram capazes de sintetizar maiores quantidades de colágeno comparado com fibroblastos de gengiva normal.

Nós também demonstramos que fibroblastos de FGH produzem aparentemente colágeno tipo I normal com a relação estequiométrica de $[\alpha 1(I)]_2[\alpha 2(I)]$. Estes resultados são consistentes aos dados da literatura que descreveram que os tipos de colágenos e as relações estequiométricas são as mesmas em gengivas normais e hiperplasias gengivais generalizadas induzidas por drogas ou de origem genética (Becker et al., 1967; Johnson et al., 1986).

Os dados na literatura em relação a proliferação celular e síntese de colágeno por fibroblastos de FGH são controversos. Explicações para estas diversidades de resultados são difíceis. Contudo, possíveis explicações incluem diferenças nas

condições de cultura como obtenção e manuseio das linhagens celulares, e variações inter-indivíduos dos pacientes influenciadas por fatores sistêmicos e/ou ambientais. A paciente do estudo de Johnson et al. (1986) apresentava hipertricrose, macroglossia e anomalias faciais em associação com o aumento gengival. Estes autores classificaram este caso como síndrome de Zimmerman-Laband. No trabalho de Oikarinen et al. (1990) a paciente apresentava além do aumento gengival, deficiência nos níveis de hormônios do crescimento. Os pacientes do estudo de Shirasuna et al. (1989) e Tipton et al. (1997) não apresentaram nenhuma outra alteração em associação com a FGH, assim como foram os pacientes do nosso estudo; desta forma, as diferenças encontradas entre estes estudos podem ter sido influenciadas por variações inter-indivíduos.

Outra possível explicação para tal diversidade de resultados pode ser apoiada na teoria da subpopulação celular proposta por Hassell and Cooper (1980) e confirmada por Phipps et al. (1997). Estes autores demonstraram que existem subpopulações de fibroblastos gengivais com diferenças genotípicas e funcionais, mas com similaridades morfológicas, em tecidos normais e alterados. Esta hipótese de diferentes subpopulações celulares é suportada por diferenças significantes nos níveis de produção de várias moléculas da MEC como colágeno, fibronectina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos. (Hassell et al., 1976; Ko et al., 1977; Hassell and Stanek, 1983; Bordin et al., 1984; Narayanan and Page, 1985). Estes estudos sugerem que alterações no tecido conjuntivo gengival podem ser resultado da estimulação e da instabilidade das subpopulações de fibroblastos residentes, e não, da presença de um novo tipo alterado, sendo que as proporções dos vários subtipos celulares e as atividades podem ser reguladas por mediadores químicos tal como citocinas.

Outro fato importante que apoia o uso desta hipótese na FGH está relacionado com o início das manifestações clínicas. A FGH é raramente observada ao nascimento ou meses após o nascimento. O notável aumento gengival necessário para o diagnóstico da doença é apenas observado durante as fases de erupção da dentição decídua, sugerindo que o trauma e/ou os produtos da inflamação gengival podem contribuir para a seleção e ativação de subpopulações de fibroblastos capazes de proliferar mais rapidamente e/ou sintetizar elevados níveis de MEC. Embora as condições inflamatórias sejam de curta duração, fibroblastos de tecidos fibróticos, pelo menos *in vitro*, podem manter o fenótipo ativado mesmo na ausência de fatores de estimulação (Le Roy, 1974; Hassell et al., 1976; Duncan and Berman, 1987; Jordana et al., 1988).

Embora nossos resultados de proliferação e síntese de colágeno divergem de alguns trabalhos na literatura que utilizam fibroblastos gengivais de pacientes com FGH, é interessante notar que estes resultados são consistentes com vários estudos de drogas induzindo hiperplasia gengival (Vernillo and Schwartz, 1987; Narayanan et al., 1988; Salo et al., 1990), e estudos de desordens fibróticas que atingem pulmões, rins e pele (Le Roy, 1974; Thompson and Helliday, 1983; Jordana et al., 1988). Fibroblastos gengivais de pacientes com hiperplasia gengival induzida por fenitoína ou nifedipina mostraram maior velocidade de proliferação e maior produção de colágeno que pacientes não reativos a droga (Narayanan et al., 1988; Fujii et al., 1994). A adição de fenitoína à culturas de fibroblastos gengivais também resulta em um aumento na síntese de colágeno (Vernillo and Schwartz, 1987).

Citocinas podem estimular a proliferação de fibroblastos tão bem quanto a síntese de colágeno. Devido a este fato, nós decidimos investigar os níveis de produção de quatro citocinas (IL-1 β , IL-6, TGF- β 1 e TNF- α) descritas na literatura como fator mitótico e/ou estimulante da síntese de colágeno em fibroblastos de FGH, e comparar com a produção de fibroblastos oriundos de GN. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que analisa a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em fibroblastos provenientes de hiperplasias gengivais.

As citocinas apresentam importantes funções não apenas na manutenção da homeostasia celular, mas também na patogênese de muitas doenças, principalmente relacionadas ao periodonto. Elevados níveis de produção de IL-6 e TGF- β 1 por fibroblastos de FGH, apresentados nesta dissertação estão em concordância com os resultados de outros estudos, que analisando fibroblastos isolados de tecidos fibróticos demonstraram, embora em tecidos diferentes aos gengivais e em doenças diferentes a FGH, aumentados níveis de expressão destas citocinas (Piguet et al., 1989; Broekelmann et al., 1991; Giri et al., 1988; Coker and Laurent, 1998; Takemura et al., 1998; Haque et al., 1998).

Estudos utilizando bleomicina como indutor de fibrose pulmonar demonstraram aumento na expressão gênica de TGF- β 1 em paralelo com o aumento na expressão e deposição de colágeno (Hoyt and Lazo, 1988). Elevados níveis de expressão e produção de TGF- β 1 foram também observados em fibroses pulmonares de humanos (Brockelman et al., 1991). Giri et al. (1988) aplicando anticorpos anti-TGF- β 1 demonstraram uma redução na deposição de colágeno e, conseqüentemente da fibrose em camundongos induzidos por bleomicina. Tipton and Dabbous (1998) descreveram elevados níveis de produção de TGF- β 1 e TGF- β 2 em fibroblastos de FGH quando comparado com células normais. Estes autores também descreveram

que não existiu diferenças significativas nos níveis de expressão de TGF- β mRNA entre os tipos celulares, como revelado pela técnica de RT-PCR. Desta forma, podemos especular que o aumento na produção de TGF- β é devido a diferenças pós-transcricionais entre fibroblastos de FGH e fibroblastos normais.

A adição de anticorpos anti-TGF β ao meio de cultura de fibroblastos de FGH produziu moderada diminuição nos níveis de colágeno, mas em todas as linhagens celulares, os níveis de produção continuaram maiores que os das células controle (Tipton and Dabbous, 1998). Estes resultados sugerem que a estimulação autócrina de TGF- β parece estar envolvida com a regulação da produção de colágeno, mas outros mecanismos podem também estar envolvidos, isto é, níveis basais aumentados ou estimulação por outros fatores de crescimento como por exemplo IL-6.

Ao contrário da FGH e fibroses pulmonares, no escleroderma sistêmico de pele, doença caracterizada pela deposição de grandes quantidades de colágeno, a expressão de TGF- β foi a mesma ou ligeiramente elevada (Needleman et al., 1990; Vuorio et al., 1991). Estas diferenças podem ser devido a doença ou ao tipo de tecido analisado. Por outro lado, níveis elevados de IL-6 são observados em paralelo a produção de colágeno por fibroblastos da pele de pacientes com esta doença (Takemura et al., 1998; Zurita-Salinas et al., 1998). Níveis elevados de expressão de IL-6 são também observados em fibroses da submucosa oral (Haque et al., 1998); quelóides (Grahary et al., 1995) e mielofibroses (Rameshwar et al., 1998).

TGF- β são secretados de forma constitutiva, principalmente na forma latente (inativa) (Lawrence et al., 1985) e devem ser ativados antes de avaliados por ELISA, o qual detecta principalmente formas ativas. Contudo, recentes estudos descreveram a secreção de formas ativas por queratinócitos e células tumorais, e demonstraram que a quantidade, apesar de pequena, é suficiente para agir nas células de forma autócrina (Glick et al., 1990; Anteaga et al., 1990).

Por ser a característica mais evidente, o acúmulo anormal de tecido conjuntivo tem tradicionalmente sido considerado resultado do aumento local na deposição de MEC. Contudo, recentes estudos têm reconhecido a importância dos mecanismos de degradação e remodelação da MEC. A relativa importância de cada um destes processos é ainda incerta em muitas doenças fibróticas, o qual inclui a FGH, mas sugere um sinergismo de processos. Devido a este fato e ao fato de não existir na literatura outros estudos similares em FGH, nós decidimos analisar a expressão e produção das principais MMPs e TIMPs sintetizadas por fibroblastos. Nossos dados demonstraram que a fibrose observada em pacientes com FGH esta associada, entre

outros fatores, com alterações específicas na atividade degradatória de uma maneira que favorece o acúmulo de MEC, principalmente devido a redução na expressão e produção de MMP-1 e MMP-2.

Alterações no balanço proteolítico de MMPs e TIMPs foram demonstradas estarem implicadas em uma variedade de modelos experimentais de fibrose *in vitro*, tão bem quanto *in vivo*. Cultura de fibroblastos de pacientes com escleroderma sistêmico expressaram menos MMP-3 e maiores quantidades de TIMP-1 favorecendo o acúmulo de matriz (Bou et al., 1994). Fibroblastos cultivados de fibrose dérmica induzida por radiação produziram níveis baixos de MMP-1 ativada em paralelo com a redução na expressão gênica (Lafuma et al., 1994). TIMP mRNAs foram aumentados nestas culturas celulares suportando a concepção de alterações no balanço degradatório. Em pacientes com cirrose, um aumento na expressão e produção de TIMPs e uma redução nos níveis de MMP-1 e MMP-2 foram identificados por ensaios imunohistoquímicos e por técnicas de hibridização *in situ* (Fukuda et al., 1991; Milani et al., 1994; Iredale, 1997). Administração de CCl₄ para ratos causou uma redução na expressão de MMP-2 e um aumento na expressão de TIMP-1 e TIMP-2 em paralelo a fibrose hepática (Herbst et al., 1997; Iredale et al., 1998). Aumentos nas expressões de TIMP-1 e TIMP-2 mRNAs foram também demonstrados em fibroses renais induzidas por diabetes (Nakamura et al., 1994), proteinúria (Eddy and Giachelli, 1995), obstrução tumoral (Diamond, 1995) e administração de ciclosporina (Duymelinck et al., 1998). Fukuda et al. (1998) analisando mudanças na expressão de componentes da MEC, MMPs e TIMPs em pacientes com fibrose pulmonar descreveram uma redução na expressão de MMP-1, MMP-2 e MMP-9 e um aumento na expressão de TIMP-1 em associação com o aumento na produção de colágenos tipos I, III e IV e fibronectina. De forma geral, estes estudos e os resultados aqui apresentados sugerem que a desregulação no balanço proteolítico de MMPs-TIMPs pode ser um dos mecanismos base para as doenças caracterizadas por fibrose tecidual.

Devido ao fato de MMP-2 atuar principalmente sobre colágeno tipo IV, o colágeno da membrana basal, o papel biológico desta reduzida expressão em FGH é incerta. Contudo, recentemente foi demonstrado que MMP-2 pode degradar colágeno tipo I nativo (Aimes and Quigley, 1995). Conseqüentemente, estas alterações parecem favorecer uma redução no catabolismo do colágeno, o qual pode contribuir para um acúmulo mesmo na ausência de aumento da expressão gênica.

A expressão de MMPs e TIMPs é regulada por uma série de citocinas entre as quais estão IL-1, TNF- α , PDGF, bFGF e EGF (Murphy et al., 1990; 1991; Matrisian et

al., 1990; Murphy and Hembry, 1992). Recentemente, Iredale et al. (1991) demonstraram a influência de TGF- β 1 na expressão de MMPs e TIMPs. A adição de TGF- β 1 a culturas celulares de células estreladas hepáticas, células associadas aos fenômenos de cirrose, diminuiu a expressão de MMP-1, por outro lado, estimulou a expressão de MMP-2, TIMP-1, TIMP-2 e colágeno. Visto que TGF- β 1 pode influenciar a produção de MMPs e TIMPs tão bem quanto estimular a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno (Ignatz et al., 1986; Overall et al., 1989b; Edwards et al., 1992; Klim et al., 1998), nós decidimos determinar se o efeito autócrino de TGF- β 1 poderia suportar as alterações na expressão e produção de MMPs e TIMPs. Em nossos estudos, a neutralização de TGF- β 1 promoveu uma ligeira estimulação na expressão de MMP-1 e uma brusca diminuição em MMP-2, enquanto que não influenciou na expressão de TIMPs. Estes resultados sugerem diferentes vias de estimulação para MMPs e TIMPs. Enquanto as MMPs parecem ser reguladas por efeitos autócrinos de TGF- β 1, TIMPs não. Estes dados também sugerem um potencial fibrogênico a TGF- β 1, primeiro por estimular a síntese de colágeno e, em segundo por inibir a síntese de MMPs. Resultados similares foram observados também em hiperplasias gengivas resultantes do tratamento com ciclosporina (Thomason et al., 1998), um regime associado com aumento nos níveis de produção de TGF- β 1 (Shin et al., 1998).

Nossos estudos também revelaram que os níveis de TIMPs em fibroblastos de GN foram ligeiramente maiores ou equivalentes a aqueles de fibroblastos de FGH e remanescem inalterados após neutralização de TGF- β 1. Geralmente, TGF- β 1 esta associada com um aumento na produção de TIMP-1 (Overall et al., 1989a; 1989b). Contudo, ciclosporina induzindo fibrose gengival focal esta associada com aumentos na expressão de TIMP-1 e diminuição na expressão de MMPs (Duymelinck et al., 1998). Os resultados de MMPs e TIMPs em FGH comparados com ciclosporina induzindo aumento gengival sugerem que diferentes subpopulações de células gengivais estão afetadas a cada instante, ou que a base destas condições não está completamente associada com a estimulação autócrina de TGF- β 1 sozinha.

Em relação a Hsp47, o presente estudo demonstrou que Hsp47 foi produzida em maiores quantidades por fibroblastos FGH como revelado pelos ensaios de Western blot e imunoprecipitação. Foi também demonstrado que a elevada expressão de Hsp47 mRNA em fibroblastos de FGH, correlaciona com o aumento nos níveis de produção de colágeno. Neste estudo, utilizando a técnica de dupla marcação e análise por microscopia confocal, nós fomos capazes de mostrar a colocalização de Hsp47 e colágeno tipo I nas regiões do RE e compartimentos

intermediários. Em adição, demonstramos que a expressão de Hsp47 é modulada por condições de estresse e por pró-peptídeos correspondendo a região N-terminal das cadeias $\alpha 1(I)$.

Proteínas destinadas a secreção são geralmente transportadas ao RE e posteriormente ao complexo de Golgi antes de serem secretadas ao meio extracelular (Alberts et al., 1994). Esta etapa parece ser fundamental para os eventos de maturação e estruturação correta das moléculas. Foi demonstrado que proteínas *chaperones* residentes do RE participam dos eventos de maturação e regulam algumas das etapas de translocação (Jungnickel et al., 1994). Por exemplo, colágenos fibrilares são secretados como três cadeias α que se associam entre si e adquirem a estrutura de tripla hélice nos compartimentos do RE. Hsp47 e outras proteínas *chaperones* (Grp94, Grp78 e PDI) foram sugeridas como sendo as responsáveis pela regulação da polimerização e formação da estrutura terciária de moléculas de colágeno (Nakai et al., 1992; Sauk et al., 1994; Ferreira et al., 1994). Nesta dissertação foram empregadas as técnicas de imunoprecipitação utilizando anticorpos anti-Hsp47 e colágeno tipo I para demonstrar a associação entre Hsp47 e colágeno tipo I nas fases iniciais de maturação da molécula.

A idéia que um complexo de *chaperones* é necessário para o processamento, maturação e translocação de proteínas em formação através das organelas celulares não é exclusiva de colágeno. Melnick et al. (1992) demonstraram que Grp78 e Grp94 são fundamentais para a estruturação correta de imunoglobulinas. Em *E. coli*, DnaK (Hsp70) reconhece cadeias nascentes de proteínas e associa com DnaJ na estabilização dos polipeptídeos em um estado intermediário a estrutura terciária da molécula. Em um processo dependente de GrpE e energia proveniente da hidrólise de ATP, a molécula em estruturação é transferida para GroEL (Hsp60), o qual catalisa a conformação terciária final (Langer et al., 1992). A concepção que um número de *chaperones* existem em associação a um heterocomplexo foi primeiro descrito por Pendew and Whitilaw (1991), quando encontraram três proteínas, Hsp90, Hsp56 e Hsp70, em ensaios de purificação de Hsp90 de extratos celulares. Posteriormente, os receptores do hormônio progesterona foram demonstrados estarem associados a heterocomplexos que contém estas três HSPs (Pratt, 1993).

A exata seqüência de interações durante a maturação e translocação dos colágenos fibrilares não esta ainda estabelecida. Contudo, algumas informações descritas por Ferreira et al. (1994) na análise de polissomos contendo cadeias nascentes de colágeno tem contribuído para o entendimento parcial de alguns dos eventos envolvidos. Quando polissomos isolados de fibroblastos 3T3 foram

fracionados por cromatografia de afinidade em Q-Sepharose, e ensaios de imunoprecipitação utilizando anticorpos anti-Hsp47 ou anti-colágeno tipo I foram realizados com a fração não ligante (fração que contém as cadeias nascentes nos estágios iniciais de formação), foram observados a precipitação de pró-colágeno, PDI e Hsp47. Por outro lado, quando ensaios similares foram realizados com o eluato (fração que contém a molécula na estrutura de tripla hélice), ocorreu a precipitação de pró-colágeno, Grp78, Grp94 e Hsp47. Estes resultados permitem concluir que logo após a entrada das cadeias nascentes no lúmen no RE, Hsp47 e PDI rapidamente associam com as cadeias e que, nos estágios finais da maturação, Grp78 e Grp94 são importantes para a estruturação e/ou importantes como *checkpoints* da molécula, prevenindo a formação de estruturas incorretas. Adicionalmente, permite concluir que Hsp47 funciona como uma *chaperone* para os eventos de estruturação e transporte da molécula no RE.

Outra importante ferramenta utilizada para examinar as interações entre colágeno e Hsp47 é encontrada em pacientes com osteogênese imperfeita (Chessler and Byers, 1992; 1993; Kojima et al., 1997). Estes estudos demonstram que moléculas de colágeno malformadas formam complexos estáveis com Grp78 e Hsp47. A expressão de Grp94 também é aumentada, mas ao contrário das outras duas HSPs, Grp94 não forma estrutura estável. Estes resultados sugerem primeiro que Grp78 pode funcionar como uma molécula de verificação, com a capacidade de analisar e reconhecer estruturas incorretamente formadas e, em segundo, permite especular a participação de Hsp47 no sistema proteolítico associado ao RE. A participação de Grp78 neste sistema foi descrita em estudos que analisaram imunoglobulinas mutantes (Hendershot et al., 1988; Klausner and Sitia, 1990; Melnick et al., 1992).

Como demonstrado nesta dissertação e em outros estudos (Ferreira et al., 1994; Satoh et al., 1996), Hsp47 parece funcionar como uma proteína *chaperone* para cadeias nascentes de colágeno. Embora demonstrado que Hsp47 apresenta função importante no controle da produção de colágeno sob condições de estresse celular, o papel biológico sob condições normais tem recebido grande atenção nos últimos anos. Os níveis de Hsp47 foram mostrados estar alterados após modulação da síntese de colágeno através de condições fisiológicas tal como diferenciação das células F9 por indução com ácido retinóico (Ferreira et al., 1996) e através de condições patológicas tal como fibrose renal, hepática e pulmonar (Masuda et al., 1994; Razzaque and Taguchi, 1997; Sunamoto et al., 1998a; Razzaque et al., 1998a; 1998b; 1998c; Cheng et al., 1998; Moriyama et al., 1998). Em condições

patofisiológicas, um aumento na expressão de Hsp47 e colágeno tipo I mRNAs foi demonstrado por Northern blot durante a progressão da fibrose hepática induzida por CCl₄ (Masuda et al., 1994). Estes autores também demonstraram que a indução de Hsp47 não é causada diretamente pela toxicidade de CCl₄, mas é induzida em paralelo com a progressão da fibrose.

Razzaque et al. (1998a) descreveram a produção de Hsp47 e colágenos tipos I e III em ratos induzidos a fibrose pulmonar por bleomicina. Estes autores observaram que a quantidade de colágenos tipo I e III e Hsp47 foram progressivamente aumentando durante o desenvolvimento de fibrose. Adicionalmente, através de ensaios imunohistoquímicos demonstraram a colocalização de Hsp47 e colágenos. Recentemente, Kuroda et al. (1998) demonstraram elevada expressão de Hsp47 mRNA e proteína em pacientes com esclerose sistêmica. Estes autores também analisaram o efeito de citocinas (TGF- β , IL-4 e INF- γ) na produção de Hsp47 por fibroblastos isolados destes pacientes. TGF- β e IL-4 aumentaram os níveis de Hsp47 mRNA, enquanto INF- γ reduziu. Os resultados permitem concluir que TGF- β e IL-4 são potentes candidatos para a patogênese da doença, enquanto que INF- γ é importante agente anti-fibrótico e pode ser importante fármaco no tratamento da esclerose sistêmica, tão bem quanto em outros modelos de fibrose tecidual. Um aumento na expressão de Hsp47 e colágeno foi também detectado *in vitro* durante a fibrose renal induzida por nefrectomia (Sunamoto et al., 1998); por tratamento com soro sangüíneo contendo anticorpos anti-timócitos (Razzaque and Taguchi, 1997) e por administração do antibiótico gentamicina (Cheng et al., 1998). Em humanos, um aumento na expressão de Hsp47 em paralelo com a expressão de colágeno foi observada em pacientes com nefropatia diabética e nefroesclerose hipertensiva (Razzaque et al., 1998).

Estudos por RT-PCR demonstraram que a expressão de Hsp47 mRNA é aumentada em fibroblastos de FGH. A identificação do(s) sinal(is) que ativa o acúmulo de Hsp47 mRNA é de considerável importância para o entendimento dos mecanismos moleculares da fibrose gengival de pacientes com FGH. É bem conhecido que sob condições de estresse, Hsp47 é rapidamente induzida via o sistema fator-elemento de choque térmico localizado entre os nucleotídeos -61 e -79 do gene Hsp47 (Hosakawa et al., 1993). Contudo, os mecanismos envolvidos na regulação de Hsp47 em condições de homeostasia celular são ainda desconhecidos. Para o momento, nós conhecemos que a região promotora do gene Hsp47 contém uma região TATAbox, quatro sítios de ligação Sp-1 e um sítio de ligação AP-1

(Hosakawa et al., 1993). Possíveis candidatos para este mecanismo regulatório incluem a família GATA de fatores de transcrição e a família TGF- β .

Recentemente, o fator de transcrição GATA-4, um fator de transcrição induzido por ácido retinóico, foi demonstrado ligar a região promotora do gene Hsp47 de células F9, sugerindo que GATA-4 pode também controlar outros genes envolvidos com a formação de MEC (Wang et al., 1994). Yamamura et al. (1998) demonstraram que TGF- β 1 é capaz de ligar a duas porções da região franqueadora, -3,9 a -2,7 Kbp e -280 a -50 bp, do gene Hsp47 e desencadear a síntese protéica. Como demonstrado nesta dissertação e no recente estudo de Tipton e Dabbous (1998), fibroblastos de FGH produzem elevados níveis de TGF- β 1, o qual poderia agir de forma autócrina na própria célula. Contudo, onde a indução de Hsp47 em fibroblastos de FGH é regulada por uma destas vias, e onde a indução paralela de Hsp47 e colágeno é regulada pelos mesmos mecanismos são ainda incertos.

O estudo comparativo da influência de diferentes formas de estresse na síntese de colágeno e a resposta a pró-peptídeos, mostrados aqui, revelaram que fibroblastos de FGH e GN respondem de maneira muito similar. Contudo, em condições de homeostasia, fibroblastos de FGH produzem maiores quantidades de colágeno e Hsp47. A base para estes aumentados níveis é ainda incerta, mas a desregulação na produção de TGF- β 1 e IL-6, fornece fortes evidências para a patogênese da FGH através de um efeito autócrino destas citocinas.

A propriedade de Hsp47 ligar a gelatina, base para a descoberta da proteína (Kurkimen et al., 1984), é mediada por ligações com as regiões de repetição Gly-X-Y localizada na porção central da molécula (Nagata et al., 1986). Em um grande número de estudos, o qual inclui esta dissertação, muito mais cadeias α 1(I) foram coprecipitadas por anticorpos anti-Hsp47 que cadeias α 2(I) e, recentes evidências demonstraram que Hsp47 liga preferencialmente a regiões específicas da porção N-terminal das cadeias α 1(I) (Hu et al., 1995). Além disso, tratamento com anti-sense oligonucleotídeos contra Hsp47 tem reduzido a produção de Hsp47 e colágeno (Sauk et al., 1994; Sunamoto et al., 1998b). Por esta razão, nosso objetivo foi o de determinar se pró-peptídeos correspondendo aos resíduos 23-108 das cadeias α 1(I) poderiam suportar um controle negativo na regulação da produção de colágeno e Hsp47. Estes estudos revelaram que NP1 diminui a produção de colágeno e dramaticamente reduz os níveis de Hsp47 em fibroblastos de FGH. Análise por microscopia confocal demonstrou a localização de NP1-GST e Hsp47. Estes resultados sugerem que NP1 inibe a produção de colágeno por competir com cadeias nascentes por Hsp47.

Por outro lado, pró-peptídeos correspondendo a porções N e C-terminal de $\alpha 1(I)$ foram demonstrados diminuir os níveis de colágeno mRNA (Paglia et al., 1979; Wu et al., 1986). A correlação entre síntese de colágeno e níveis de mRNA foram também demonstrados por Uitto et al. (1985), indicando que a relação pré-transcricional não é um fenômeno limitado. Estes autores sugeriram que pró-peptídeos poderiam atuar diminuindo a relação de transcrição ou aumentando a relação de degradação do mRNA ou, ambos. Apesar de não termos analisados os níveis de mRNA para colágeno e Hsp47, nossos resultados de microscopia confocal demonstraram que após 24 horas, NP1 estava principalmente acumulado no núcleo. Onde a redução na produção de colágeno esta associada a competição por Hsp47 ou a uma redução nos níveis de mRNA tornam através deste ponto de vista, inconclusivos apenas por este estudo.

Embora os resultados sugiram que o comportamento alterado de fibroblastos de FGH seja reflexo da estimulação autócrina de TGF- $\beta 1$, a base genética desta doença, em particular desta família, não é conhecida. Em outra família, Hart et al. (1998) mapearam FGH gene utilizando marcadores de polimorfismo para o cromossomo 2p21 entre os locus D2S1788 e D2S441. Esta região do cromossomo 2 não é diretamente associada com TGF- $\beta 1$, contudo, esta região apresenta os sítios de ligação para calmodulina, o precursor da bomba de cálcio/sódio, e para a proteína de ligação FK506. TGF- $\beta 1$ induz o domínio de ativação de transcrição de CTF-1, o protótipo membro da família de fatores de transcrição CTF/NF-1. TGF- β induz CTF-1 por sinalização de cálcio livre, o qual correlaciona com o proposto papel de controlar a bomba de cálcio/sódio. Contudo, o exato mecanismo de ação de TGF- β neste processo é ainda pobremente entendido (Alevizopoulos et al., 1997).

Em resumo, baseado nos resultados desta dissertação podemos concluir que o aumento gengival generalizado observado em pacientes com FGH é reflexo do aumento na capacidade proliferativa de fibroblastos gengivais residentes, de um aumento na produção de colágeno e de uma redução na atividade degradatória de enzimas do grupo das MMPs. Todos estes eventos biológicos sugerem ser modulados pelos estímulos autócrinos de TGF- $\beta 1$, que é produzida em grandes quantidades por fibroblastos de FGH. Em adição, podemos concluir que a FGH representa um excelente modelo experimental para estudo dos eventos regulatórios de doenças caracterizadas por hiperplasia de tecido conjuntivo

9. CONCLUSÕES

- A. Morfologicamente em condições de subconfluência celular, fibroblastos de FGH e GN apresentam típicas características estruturais, contudo, em condições de saturação da densidade celular, fibroblastos de FGH são menores que fibroblastos de GN.
- B. Linhagens celulares de fibroblastos de FGH apresentaram uma velocidade proliferativa maior que linhagens de fibroblastos de GN.
- C. A quantidade de colágeno tipo I produzida por fibroblastos de FGH é maior que células normais. Este colágeno apresenta típica distribuição estequiométrica.
- D. A expressão e produção de Hsp47 em fibroblastos de FGH é regulada por estresse e por pró-peptídeos correspondendo a porções N-terminal das cadeias $\alpha 1(I)$.
- E. A produção de IL-6 e TGF- $\beta 1$ são elevadas em fibroblastos de FGH quando comparadas com fibroblastos de GN, enquanto que as citocinas IL-1 β e TNF- α não foram produzidas por todas as linhagens celulares de fibroblastos de GN e FGH.
- F. A reduzida expressão de MMP-1 e MMP-2 por fibroblastos de FGH pode contribuir por um balanço proteolítico desregulado, o qual favorece o acúmulo de tecido fibroso. A expressão de MMP-1 e MMP-2 é controlada pelo efeito autócrino de TGF- $\beta 1$.
- G. A expressão de TIMP-1 e TIMP-2 é reduzida em linhagens celulares de pacientes com FGH quando comparado com células de GN. Esta expressão não é regulada pelos estímulos autócrinos de TGF- $\beta 1$.

12. Referências Bibliográficas

- Abbas A.K.; Lichtman A.H.; Pober J.S. (1997) Cellular and molecular immunology, 3^o ed, 492 p.
- Agarraberes F.A.; Terlecky S.R.; Dice J.F. (1997) An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J Cell Biol*, 137: 825-834.
- Aimes R.T.; Quigley J.P. (1995) Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase-inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific $\frac{3}{4}$ and $\frac{1}{4}$ length fragments. *J Biol Chem*, 270: 5872-5876.
- Alberts B.; Bray D.; Lewis J.; Raff M.; Watson J.D. (1994) Molecular Biology of the Cell, 2^o ed.
- Alevizopoulos A.; Dusserre Y.; Ruegg U.; Mermod N. (1997) Regulation of the transforming growth factor beta-responsive transcription factor CTF-1 by calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV. *J Biol Chem*, 272: 23597-23605.
- Alvares O.; Klebe R.; Grant G.; Cochran D.L. (1995) Growth factor effects on the expression of collagenase and TIMP-1 in periodontal ligament cells. *J Periodontol*, 13: 552-558.
- Amin J.; Ananthan J.; Voellmy R. (1988) Key features of heat shock regulatory elements. *Mol Cell Biol*, 8: 3161-3169.
- Anfinsen C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181: 223-230.
- Ang D.; Liberek K.; Skowrya D.; Zylitz M.; Georgopoulos C. (1991) Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins. *J Biol Chem*, 266: 24233-24236.
- Arteaga C.L.; Coffey R.J.; Dugger T.C.; McCutchen C.M.; Moses H.L.; Lyons R. (1990) Growth stimulation of human breast cancer cells with anti-transforming growth factor b antibodies: Evidence for negative autocrine regulation by transforming growth factor b. *Cell Growth Differ*, 1: 367-374.
- Autio-Harmainen H.; Karttunen T.; Hurskainen T.; Hoyhtya M.; Kauppila A.; Tryggvason K. (1993) Expression of 72 Kilodalton type IV collagenase (gelatinase A) in benign and malignant ovarian tumors. *Lab Invest*, 69: 312-321.
- Awad M.R.; El-Gamel A.; Haleston P.; Turner D.M.; Sinnott P.J.; Hutchinson IV. (1998) Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association

with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation*, 66:1014-1020.

Bakaeen G.; Scully C. (1991) Hereditary gingival fibromatosis in a family with the Zimmermann-Laband syndrome. *J Oral Pathol Med*, 20: 457-459.

Barlowe C.; Orci L.; Yeung T.; Hosobuchi M.; Hamamoto S.; Salama N.; Rexach M.F.; Ravazzola M.; Amherdt M.; Schekman R. (1994) COPII: a membrane coat formed by sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*, 77: 895-907.

Becker W.; Collings C.K.; Zimmerman E.R.; De La Rosa M.; Singdahlsen D. (1967) Hereditary gingival fibromatosis. *Oral Surg*, 24: 313-318.

Beckmann R.P.; Mizzen L.A.; Welch W. (1990) Interaction of hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science*, 248: 850-854.

Bernot A.; Clepet C.; Dasilva C.; Devaud C.; Petit J.L.; Caloustian C.; Cruaud C.; Samson D.; Pulcini F.; Weissenbach J.; Heilig R.; Notanicola C.; Domingo D.; Rozenbaum M.; Benchetrit E.; Tpaloglu R.; Dewalle M.; Dross C.; Hadjari P.; Dupont M.; Demaille J.; Touitou M.; Grateau G. (1997) A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nature Genet*, 17: 25-31.

Beutler B. (1995) TNF, immunity and inflammatory disease: Lessons of the past decade. *J Invest Med*, 43: 227-235.

Bielinska M; Wilson D.B. (1995) Regulation of J6 gene expression by transcription factor GATA-4. *Biochem J*, 307: 183-189.

Bikerdal-Hansen, H. (1993) Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*, 64: 474-484.

Bitzer M.; Sterzel R.B.; Bottinger E.P. (1998) Transforming growth factor-beta in renal disease. *Kidney Blood Press Res*, 21: 1-12.

Blumenkrantz N.; Assad R.; Peterkolsky B. (1984) Characterization of collagen hydroxyllysyl glycosyl transferases as mainly intramembranous microsomal enzymes. *J Biol Chem*, 259: 854-859.

Borden P.; Heller R.A. (1997) Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Eukariot Gen Expression*, 7: 159-178.

Bordin J.S.; Page R.C.; Narayanan A.S. (1984) Heterogeneity of human diploid fibroblasts: isolation and characterization of one phenotype. *Science*, 223: 171-173.

Bou G.G.; Osman J.; Black C.; Oslen I. (1994) Excess matrix accumulation in scleroderma is caused partly by differential regulation of stromelysin and TIMP-1 synthesis. *Clin Chim Acta*, 231: 69-78.

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.; Aldred M.J. (1994) Hereditary gingival fibromatosis: report of an extensive four-generation pedigree. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 78: 452-454.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Bioch*, 72: 248-254.

Bresnihan B.; Alvaro-Gracia J.M.; Cobby M.; Doherty M.; Domljan Z.; Emery P.; Nuki G.; Pavelka K.; Rau R.; Rozman B.; Watt I.; Williams B.; Aitchison R.; McCabe D.; Musikic P. (1998) Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum*, 41: 2196-2204.

Broekelmann T.J.; Limper A.H.; Colby T.V.; McDonald J.A. (1991) Transforming growth factor- β 1 is present at sites of extracellular matrix expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 6642-6646.

Brown C.R.; Martin R.L.; Hansen W.J.; Beckmann R.P.; Welch W.J. (1993) The constitutive and stress inducible forms of Hsp70 exhibit functional similarities and interact with one another in an ATP-dependent fashion. *J Cell Biol*, 120: 1101-1112.

Bugeson R.E. (1988) New collagens, new concepts. *Annu Rev Cell Biol*, 4: 551-577.

Butler G.S.; Butler M.J.; Atkinson S.J.; Will H.; Tamura T.; van Westrum S.S.; Crabbe T.; Clements J.; d'Ortho M.P.; Murphy G. (1998) The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase 'receptor' regulates the concentration and efficient activation of progelatinase. *A J Biol Chem*, 273: 871-880.

Cabrini R.L.; Schwint A.E.; Mendez A.; Femopase F.; Lanfranchi H.; Itoiz M.E. (1992) Morphometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 21: 275-279.

Caplan A.J.; Langley E.; Wilson E.M.; Vidal J. (1994) Hormone-dependent transactivation by the human androgen receptor is regulated by a DnaJ protein. *J Biol Chem*, 270: 5251-5257.

- Chatterjee R.; Mukhopadhyay D.; Chakraborty R.N.; Basu Mitra R. (1997) Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in oral carcinomas in relation to human papillomavirus infection and cytokinetics. *J Oral Pathol Med*, 26: 310-314.
- Cheetham M.E.; Jackson A.P.; Anderton B.H. (1994) Regulation of 70-kDa heat-shock-protein ATPase activity substrate binding by human DnaJ-like proteins, HsJ1a and HsJ1b. *Eur J Biochem*, 226: 99-107.
- Chen J.K.; Hoshi H.; McKeehan W.L. (1987) Transforming growth factor type b specifically stimulates synthesis of proteoglycan in human adult arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 5287-5291.
- Cheng M.; Razzaque M.S.; Nazneen A.; Taguchi T. (1998) Expression of the heat shock protein 47 in gentamicin-treated rat kidneys. *J Exp Path*, 79: 125-132.
- Chessler S.D.; Byers P.H. (1992) Defective folding and stable association with protein disulfide isomerase /prolyl/ hydroxylase of type I procollagen with a deletion in the pro $\alpha 2(1)$ chain that preserves the Gly-X-Y repeat pattern. *J Biol Chem*, 267: 7751-7757.
- Chessler S.D.; Byers P.H. (1993) BiP binds type I procollagen pro α chains with mutations in the carboxy-terminal propeptide synthesized by cells from patients with osteogenesis imperfecta. *J Biol Chem*, 268: 18226-18233.
- Chin J.R.; Murphy, G.; Werb Z. (1985) Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. *J Bio Chem*, 260: 12367-12376.
- Chirico W.J.; Waters M.G.; Blobel G. (1988) 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, 332: 805-810.
- Ciocca D.R.; Oesteneich S.; Chammes G.C.; McGuire U.L.; Fuqua S.A. (1993) Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *J Natl Cancer Int*, 85: 1558-1570.
- Clairmont C.A.; DeMaio A.; Hirschberg C.B. (1992) Translocation of ATP into the lumen of rough endoplasmic reticulum-derived vesicles and its binding to luminal proteins including BiP (Grp78) and Grp94. *J Biol Chem*, 267: 3983-3990.
- Clarke E.P.; Cates G.A.; Ball E.H.; Sanwall B.D. (1991) A collagen-binding protein in the endoplasmic reticulum of myoblasts exhibiting relationship with serine protease inhibitors. *J Biol Chem*, 266:17230-17235.

Clarke E.P.; Jain N.; Brickenden A.; Lorimer I.A.; Sanwal B.D. (1993) Parallel regulation of procollagen I and colligin, a collagen-binding protein and a member of the serine protease inhibitor family. *J Cell Biol*, 121:193-199.

Coker R.K.; Laurent G.J. (1998) Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. *Eur Respir J*, 11: 1218-1221.

Collan Y.; Ranta H.; Vartio T. (1982) Histochemical and biochemical study of hereditary fibrous hyperplasia of the gingiva. *Scan J Dent Res*, 90: 20-25.

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

Davis E.C.; Mecham R.P. (1996) Selective degradation of accumulated secretory proteins in the endoplasmatic reticulum. *J Biol Chem*, 271: 3787-3794.

Declerck Y.A.; Perez N.; Shimada H.; Boone T.C.; Langley K.E.; Taylor S.M. (1992) Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res*, 52: 701-708.

Defacque H.; Piquemal D.; Basset A.; Marti J.; Commes T. (1999) Transforming growth factor- β 1 is an autocrine mediator of U937 cell growth arrest and differentiation induced by vitamin D3 and retinoids. *J Cell Physiol*, 178: 109-119.

DeLuca C.; McKay D.B.; Parhan P.; Hill B.L. (1990) Uncoating protein (Hsc70) binds a conformationally labile domain of clathrin light chain LCa to stimulate ATP hydrolysis. *Cell*, 62: 875-887.

Diamond J.R. (1995) Macrophages and progressive renal disease in experimental hydronephrosis. *Am J Kidney Dis*, 26: 133-140.

Dioszegi M.; Cannon P.; Van Wart H. (1995) Vertebrate Collagenases in *Methods in Enzymology*, 248: 413-449.

Dixon J.L.; Furukawa S.; Ginsberg H.N. (1991) Oleate stimulates secretion apolipoprotein B-containing lipoproteins from HepG2 cells by inhibiting early intracellular degradation of apolipoprotein B. *J Biol Chem*, 266: 5080-5086.

Dolbeare F. (1996) Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part III. Proliferation in normal, injured and diseased tissue, growth factors, differentiation, DNA replication sites and in situ hybridization. *Histochem J*, 28: 531-575.

Dorner A.J.; Wasley L.C.; Kaufman R.J. (1989) Increased synthesis of secreted proteins induce expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 266:20602-20607.

Duncan M.; Berman B. (1987) Persistence of a reduced-collagen-producing phenotype in cultured scleroderma fibroblasts after short-term exposure to interferons. *J Clin Invest*, 79: 1318-1324.

Duymeinck C.; Deng J-T.; Dauwe S.E.H.; Broe M.E.; Verpooten G.A. (1998) Inhibition of the matrix metalloproteinases system in a rat model of chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney Int*, 54: 804-818.

Echols H. (1990) Nucleoprotein structures initiating DNA replication, transcription, and site-specific recombination. *J Biol Chem*, 265:14697-14700.

Eddy A.A.; Giachelli C.M. (1995) Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria. *Kidney Int*, 47: 1546-1557.

Edington S.M. (1992) Rites of passage: Moving proteins through the ER. *Biotechnol*, 10: 1413-1420.

Edwards D.R.; Murphy G.; Reynolds J.J.; Whitham S.E.; Docherty A.J.; Angel P.; Heath J.K. (1987) Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J*, 6: 1899-1904.

Edwards D.R.; Rocheleau H.; Sharma R.R.; Wills A.J.; Cowie A.; Hassell J.A.; Heath J.K. (1992) Involvement of AP1 and PEA3 binding sites in the regulation of murine tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) transcript. *Biochem Biophys Acta*, 1171: 41-55.

Ferreira, L.R.; Norris K.; Smith T.; Hebert C.; Sauk J.J. (1994) Association of Hsp47, Grp78, and Grp94 with procollagen supports the successive or coupled action of molecular chaperones. *J Cell Biochem*, 56: 518-526.

Ferreira, L.R.; Norris K.; Smith T.; Hebert C.; Sauk J.J. (1996) Hsp47 and other ER-resident molecular chaperones form heterocomplexes with each other and with collagen type IV chains. *Conn Tis Res*, 33: 265-273.

Flug M.; Köpf-Maier P. (1995) The basement membrane and its involvement in carcinoma cell invasion. *Acta Anat*, 152: 69-84.

Fogler W.E.; Volker K.; Watanabe M.; Wigginton J.M.; Roessler P.; Brunda M.J.; Ortaldo J.R.; Wilttrout R.H. (1998) Recruitment of hepatic NK cells by IL-12 is

dependent on IFN-gamma and VCAM-1 and is rapidly down-regulated by a mechanism involving T cells and expression of Fas. *J Immunol*, 161: 6014-6021.

Forsayeth J.R.; Gu Y.; Hall Z.W. (1992) BiP forms stable complexes with unassembled subunits of the acetylcholine receptor in transfected cos cells and in C2 muscle cells. *J Cell Biol*, 117:841-847.

Freedman R.B. (1989) Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Cell*, 57:1069-1072.

Freeman B.C.; Morimoto R.I. (1996) The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hsp71 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *EMBO J*, 15: 2969-2979.

Freije J.M.P.; Diezliiza I.; Balbin M.; Sanchez L.M.; Blasco R.; Tolivia J.; Lopezotin C. (1994) Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinases produced by breast carcinomas. *J Biol Chem*, 269: 16766-16773.

Fridman R.; Bird R.E.; Hoyhtya M.; Oelkuct M.; Komarek D.; Liang C.M.; Berman M.L.; Liotta L.A.; Stetler-Stevenson W.G.; Fuerst T.R. (1993) Expression of human recombinant 72 kDa gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2): characterization of complex and free enzyme. *Biochem J*, 289-411-416.

Fujii A.; Matsumoto H.; Nakao S.; Teshigawara H.; Akimoto Y. (1994) Effect of calcium-channel blockers on cell proliferation, DNA synthesis and collagen synthesis of cultured gingival fibroblasts derived from human nifedipine responders and non-responders. *Archs Oral Biol*, 39: 99-104.

Fukuda Y.; Ishizaki M.; Kudoh S.; Kitaichi M.; Yamanaka N. (1998) Localization of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest*, 78: 687-698.

Gaitanaris G.A.; Papavassiliou A.G.; Rubock P.; Silverstein S.J.; Gottesman M.E. (1990) Renaturation of denatured repressor I requires heat shock proteins. *Cell*, 61:1013-1020.

Geeta-Habib M.; Noiva R.; Kaplan H.A.; Lennarz W.J. (1988) Glycosilation site binding protein, a component of oligossacchary transferase is highly similar to three other 57 kd luminal proteins of the ER. *Cell*, 54: 1053-1060.

Geivelis M.; Turner D.W.; Peterson E.D.; Lamberts B.L. (1993) Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol*, 64: 980-983.

Gemmell E.; Seymour G.I. (1993) Interleukin-1, interleukin-6 and transforming growth factor- β production by human gingival mononuclear cells following stimulation with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. J Periodont Res, 28: 122-129.

Georgopoulos C.; Welch W.J. (1993) Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. Annu Rev Cell Biol, 19: 601-634.

Gil G.; Faust J.R.; Chin D.J.; Goldstein J.L.; Brown M.S. (1985) Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. Cell, 41: 249-258.

Gilmore R. (1993) Protein translocation across the endoplasmic reticulum: a tunnel with toll booths at entry and exit. Cell, 75: 589-592.

Giri S.N.; Hyde D.M.; Hollinger M.A. (1988) Effect of antibody to transforming growth factor- β 1 on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. Thorax, 48: 959-966.

Glick A.B.; Flanders K.C.; Danielpour D.; Yuspa S.H.; Sporn M.B. (1990) Retinoic acid induces transforming growth factor- β 2 in cultured keratinocytes and mouse epidermis. Cell Reg, 1: 87-97.

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

Gomis-Ruth F-X.; Maskos K.; Betz M.; Bergner A.; Huber R.; Suzuki K.; Yoshida N.; Nagase H.; Brew K.; Bourenkovi G.P.; Bartunik H.; Bode W. (1997) Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinases stromelysin-1 by TIMP-1. Nature, 389: 77-81.

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

Green L.A.D.; Liem R.K.H. (1989) β -internexin is a microtubule-associated protein identical to the 70-kDa heat-shock cognate protein and the clathrin uncoating ATPase. J Biol Chem, 264:15210-15215.

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

Haque M.F.; Haris M.; Meghji S.; Barret A.W. (1998) Immunolocalization of cytokines and growth factors in oral submucous fibrosis. Cytokine, 10: 713-719.

- Hart T.C.; Pallos D.; Bowden D.W.; Bolyard J.; Pettenati M.J.; Cortelli J.R. (1998) Genetic linkage of hereditary gingival fibromatosis to chromosome 2p21. *Am J Hum Genet*, 62: 876-883.
- Hassell T.M.; Cooper G.C. Phenytoin-induced gingival overgrowth in mongrel cat model. In: Hassell TM, Johnson MC and Dudley KH, eds. *Phenytoin-Induced Teratology and Gingival Pathology*, New York: Raven Press, 1980: 147-162.
- Hassell T.M.; Page R.C.; Narayanan A.S.; Cooper C.G. (1976) Diphenylhydantoin (Dilantin) gingival hyperplasia: drug-induced abnormality of connective tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73: 2909-2912.
- Hassell T.M.; Stanek E.J. (1983) Evidence that healthy human gingiva contains functionally heterogeneous fibroblasts subpopulations. *Archs Oral Biol*, 28: 617-625.
- Havemose-Poulsen A.; Holmstrup P. (1997) Factors affecting IL-1 mediated collagen metabolism by fibroblasts and the pathogenesis of periodontal disease: a review of the literature. *Crit Rev Oral Biol Med*, 8: 217-236.
- Hayes S.A.; Dice J.F. (1996) Roles of molecular chaperones in protein degradation. *J Cell Biol*, 132: 255-258.
- Hazuda D.J.; Lee J.C.; Young P.R. (1988) The kinetics of interleukin-1 secretion from activated monocytes. Differences between interleukin-1a and interleukin-1b. *J Biol Chem*, 263: 8473-8479.
- Hebert C.; Norris K.; Coletta R.D.; Reynolds M.; Ordonez J.; Sauk J.J. (1999) Cell surface colligin/Hsp47 associates with tetraspanin protein CD9 in epidermoid carcinoma cell lines. *J Cell Biochem*, 73: 248-258.
- Hefti A. (1993) Aspects of cell biology of the normal periodontium. *Periodontology* 2000, 3: 64-75.
- Hendershot L.M.; Ting J.; Lee A.S. (1988) Identity of the immunoglobulin heavy-chain-binding protein with the 78,000-dalton glucose-regulated protein and the role of post-translational modifications in its binding function. *Mol Cell Biol*, 8: 4250-4256.
- Hendil K.B.; Lauridsen A.M.B.; Seglen P.O. (1990) Both endocytic and endogenous protein degradation in fibroblasts is stimulated by serum/amino acid deprivation and inhibited by 3-methyladenine. *Biochem J*, 272: 577-581.
- Hensold J.O.; Hunt C.R.; Calderwood S.K.; Housman D.E.; Kingston R.E. (1990) DNA binding of heat shock factor to the heat shock element is insufficient for transcription activation in murine erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* 10: 1600-1608.

- Herbst H.; Wege T.; Milani S.; Pellegrini G.; Orzechowski H-D.; Béchstein W.O.; Neuhaus P.; Gressner A.M.; Schuppan D. (1997) Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol*, 150: 1647-1659.
- Hibbs M.S.; Bainton D.F. (1989) Human neutrophil collagenase is a component of specific granules. *J Clin Invest*, 84:1395-1402.
- Hightower L.E. (1991) Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell*, 66: 191-197.
- Hirayoshi K.; Kudo H.; Takechi H.; Nakai A.; Iwamatsu A.; Yamada K.M.; Nagata K. (1991) HSP47: a tissue-specific, transformation-sensitive, collagen-binding heat shock protein of chicken embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 11: 4036-4044.
- Hojo M.; Morimoto T.; Maluccio M.; Asanot T.; Morimoto K.; Lagmam M.; Shimbo T.; Suthanthiran M. (1999) Cyclosporin induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature*, 397: 530-534.
- Hosokawa N.; Takechi H.; Yokota S.; Hirayoshi K.; Nagata K. (1993) Structure of the gene encoding the mouse 47-kDa heat-shock protein (Hsp47). *Gene*, 126: 187-193.
- Houglum K.; Buck M.; Kim D.J.; Chojkier M. (1998) TNF- α inhibits liver collagen- α 1(I) gene expression through a tissue-specific regulatory region. *Am J Physiol*, 37: G840-G847.
- Howard E.W.; Bullen E.C.; Banda M.J. (1991) Preferential inhibition of 72 and 92 kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J Biol Chem*, 266: 13070-13075.
- Howekk W.M. (1977) Visualization of ribosomal gene activity: silver stains, proteins associated with RNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma*, 62: 361-367.
- Hoyt D.G.; Lazo J.S. (1988) Early increases in pulmonary mRNA encoding procollagens and transforming growth factor- β precede bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 246: 765-771.
- Hu G.; Gura T.; Sabsay B.; Sauk J.; Dixit S.N.; Veis A. (1995) Endoplasmic reticulum protein Hsp47 binds specifically to the N-terminal globular domain of the amino-propeptide of the procollagen I α 1(I)-chain. *J Cell Bioch*, 59: 350-367.
- Hughes R.C.; Taylor A.; Sage H.; Hogan B.L.M. (1987) Distinct pattern of glycosylation of collagen, a collagen-binding glycoprotein, and SPARC (osteonectin), a secreted

calcium-binding glycoprotein: Evidence for the translocalization of collagen in the ER. *Eur J Biochem*, 163: 57-65.

Hutchison K.A.; Dittman K.D.; Czar M.J.; Pratt W.B. (1994) Proof that Hsp70 is required for assembly of the glucocorticoid receptor into a heterocomplex with Hsp90. *J Biol Chem*, 269: 5043-5049.

Ignatz R.A.; Massague J. (1986) Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem*, 261: 4337-4345.

Ikegawa S.; Nakamura Y. (1997) Structure of the gene encoding human colligin-2 (CBP2). *Gene*, 194: 301-303.

Ikegawa S.; Sudo K.; Okui K.; Nakamura Y. (1995) Isolation, characterization and chromosomal assignment of human colligin-2. *Cytogenet Cell Genet*, 71: 182-186.

Imbert A.M.; Bagnis C.; Galindo R.; Chabannon C.; Mannoni P. (1998) a neutralizing anti-TGF- β 1 antibody promotes proliferation of CD34⁺Thy-1⁺ peripheral blood progenitors and increases the number of transduced progenitors. *Exper Hematol*, 26: 374-381.

Iredale J.P. (1998) Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 29: 43-54.

Iredale J.P.; Benyon R.C.; Pickering J.; McCullen M.; Northrop M.; Pawley S.; Hovell C.; Arthur M.J.P. (1998) Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. *J Clin invest*, 102: 538-549.

Jain N.; Brickenden A.; Ball E.H.; Sanwal B.D. (1994) Inhibition of procollagen I degradation by colligin: a collagen-binding serpin. *Arch Biochem Biophys*, 314: 23-30.

Jakob U.; Buchner J. (1994) Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperone. *Trends Biochem Sci*, 19: 205-211.

Jakob U.; Lilie H.; Meyer I.; Buchner J. (1995) Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthetase. *J Biol Chem*, 270: 7288-7294.

Johnson B.D.; El-Guindy M.; Ammons W.F.; Narayanan S.; Page R.C. (1986) A defect in fibroblasts from an unidentified syndrome with gingival hyperplasia as the predominant feature *J Periodont Res*, 21: 403-413.

Johnson L.L.; Dyer R.; Hupe D.J. (1998) Matrix metalloproteinases. *Curr Opin Chem Biol*, 2: 466-471.

Jordana M.; Schulman J.; McSharry C.; et al. (1988) Heterogeneous proliferative characteristics of human adult lung fibroblasts line and clonally derived fibroblasts from control and fibrotic tissue. *Am Rev Resp Dis*, 137: 579-584.

Jungnickel B.; Papoport T.A.; Hartmann E.; (1994) Protein translocation common themes from bacteria to man. *FEBS letter*, 346: 73-77.

Kerr L.D.; Holt J.T.; Matrisian L.M. (1988) Growth factors regulate transin gene expression by c-fos-dependent and c-fos-independent pathways. *Science*, 242: 1424-1427.

Kim D.S.; Korting H.C.; Schafer-Korting M. (1998) Effects of growth factors on the proliferation of human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Pharmazie*, 53: 51-57.

Kishimoto T. (1990) The biology of interleukin-6. *Blood*, 74: 1-10.

Klausner R.D.; Schwartz J.L.; Bonifacino J.S. (1990) The T cell antigen receptor: insights into organelle biology. *Annu Rev Cell Biol*, 6: 403-431.

Klausner R.D.; Sitia R. (1990) Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell*, 62: 611-614.

Klim J.; Yook I.J. (1994) Immunohistochemical study on proliferation cell nuclear antigen expression in ameloblastomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, 30: 126-131.

Klim Y.; Ratzliff V.; Choi S.G.; Lalazar A.; Theiss G.; Dang Q.; Kim S.J.; Friedman S.L. (1998) Transcriptional activation of transforming growth factor beta1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1. Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. *J Biol Chem*, 273: 33750-33758.

Knauper V.; Osthues A.; DeClerck Y.A.; Langley K.E.; Blasser J.; Tschesche H. (1993) Fragmentation of human polymorphonuclear-leucocyte collagenase. *Biochem J*, 291: 847-854.

Knittel T.; Muller L.; Saile B.; Ramadori G. (1997) Effect of tumour necrosis factor-alpha on proliferation, activation and protein synthesis of rat hepatic stellate cells. *J Hepatol*, 27: 1067-1080.

Ko S.D.; Page R.C.; Narayanan A.S. (1977) Fibroblast heterogeneity and prostaglandin regulation of subpopulations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 3429-3432.

Koch G.; Smith M.; Macer D.; Webster P.; Mortara R. (1986) Endoplasmic reticulum contains a common, abundant calcium-binding glycoprotein, endoplasmin. *J Cell Sci*, 86: 233-248.

- Kohase M.; May L.T.; Tamm I.; Vilcek J.; Sehgal PB. (1987) A cytokine network in human diploid fibroblasts: interactions of beta-interferons, tumor necrosis factor, platelet-derived growth factor, and interleukin-1. *Mol Cell Biol*, 7: 273-280.
- Kojima T.; Miyaishi O.; Saga S.; Ishiguro N.; Tsutsui Y.; Iwata H. (1997) The retention of abnormal type 1 procollagen and correlated expression of Hsp47 in fibroblasts from a patient with lethal osteogenesis imperfecta. *J Pathol*, 184: 212-218.
- Krone P.H.; Lele Z.; Sass J.B. (1997) Heat shock genes and the heat shock response in zebrafish embryos. *Biochem Cell Biol*, 75: 487-497.
- Kudo H.; Hirayoshi K.; Kitawaga Y.; Imamura S.; Nagata K. (1994) Two collagen-binding proteins, osteonectin and Hsp47, are coordinately induced in transformed keratinocytes by heat and other stresses. *Exp Cell Res*, 212: 219-224.
- Kurkinen M.; Taylor A.; Garrels J.I.; Hogan B.L.M. (1984) Cell surface-associated proteins which bind native type IV collagen and gelatin. *J Biol Chem*, 259: 5915-5922.
- Kuroda K.; Tsukifuji R.; Shinkai H. (1998) Increased expression of heat-shock protein 47 is associated with overproduction of type I procollagen in systemic sclerosis skin fibroblasts. *Invest Dermatol*, 111: 1023-1028.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lafuma C.; El Nabout R.A.; Crechet F.; Hovnanian A.; Martin M. (1994) Expression of 72-kDa gelatinase (MMP-2), collagenase (MMP-1), and tissue metalloproteinase inhibitor (TIMP) in primary pig skin fibroblast cultures derived from radiation-induced skin fibrosis. *J Invest dermatol*, 102: 945-950.
- Laiho M.; Keshi-Oja J. (1989) Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: a review. *Cancer Res*, 49: 2533-2553.
- Langer T.; Lu C.; Echols H.; Flanagan J.; Hayer M.K.; Hartl F.U. (1992) Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature*, 356: 683-689.
- Laskey R.A.; Honda B.M.; Mills A.D.; Finch J.T. (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*, 275: 416-420.
- Lawrence D.A.; Pircher R.; Julien P. (1985) Conversion of high molecular weight latent TGF- β from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active TGF- β under acidic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*, 133: 1026-1034.

- LeRoy E. (1974) Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro. *J Clin Invest*, 54: 880-889.
- Lingappa V.R. (1991) More than just a channel: provocative new features of protein traffic the ER membrane. *Cell*, 65:527-530.
- Lippincott-Schwartz J.; Bonifacino J.S.; Yuan L.C.; Klausner R.D. (1988) Degradation from the endoplasmic reticulum: disposing of newly synthesized proteins. *Cell*, 54: 209-220.
- Llano E.; Pendas A.M.; Knauper V.; Sorsa T.; Salo T.; Salido E.; Murphy G.; Simmer J.P.; Batlett J.D.; Lopez-Otin C. (1997) Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20). *Biochemistry*, 36: 15101-15108.
- MacNaul K.L.; Chartrain N.; Lark M.; Tocci M.J.; Hutchinson N.I. (1990) Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *J Bio Chem*, 265: 17238-17245.
- Maki R.G.; Old L.J.; Srivastava P.K. (1990) Human homologue of murine tumor rejection antigen gp96: 5'-regulatory and coding regions and relationship to stress-induced proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 5658-5662.
- Marshall R.I.; Bartold P.M. (1998) Medication induced gingival overgrowth. *Oral Disease*, 4: 130-151.
- Martin G.R.; Timpl R.; Muller P.K.; Kuhn K. (1985) The genetically distinct collagens. *Trends Biochem Sci*, 10: 285-287.
- Massague J. (1990) The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*, 6: 597-641.
- Massova I.; Kotra L.P.; Fridman R.; Mobashery S. (1998) Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversifications. *FASEB J*, 12: 1075-1095.
- Massuda H.; Fukumoto M.; Hirayoshi K.; Nagata K. (1994) Coexpression of the collagen-binding stress protein HSP47 gene and the $\alpha 1(I)$ and $\alpha 1(III)$ collagen genes in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J Clin Invest*, 94: 2481-2488.
- Mazzarella R.A.; Green M. (1987) ERp99, an abundant, conserved glycoprotein of the endoplasmic reticulum, is homologous to the 90-kDa heat shock protein (Hsp90) and the 94-kDa glucose regulated protein (Grp94). *J Biol Chem*, 262: 8875-8883.

McAllister B.S.; Leeb-Lundberg F.; Mellonig J.T.; Olson M.S. (1995) The functional interaction of EGF and PDGF with bradykinin in the proliferation of human gingival fibroblasts. *J Periodontol*, 66: 429-437.

Meikle M.C.; Atkinson S.J.; Ward R.V.; Muerphy G.; Reynolds J.J. (1989) Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin 1; evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. *J Periodont Res*, 24: 207-213.

Melnick J.; Aviel S.; Argon Y. (1992) The endoplasmatic reticulum stress protein Grp94 in addition to BiP associates with unassembled immunoglobulin chains. *J Biol Chem*, 267: 21303-21306.

Mesquita R.A.; Sousa S.; Araujo N.S. (1998) Proliferative activity in peripheral ossifying fibroma and ossifying fibroma. *J Oral Pathol Med* 27:64-67.

Mezger V.; Rallu M.; Morimoto R.I.; Morange M.; Renard J.P. (1994) Heat shock factor 2-like activity in mouse blastocysts. *Develop Biol*, 166 : 819-822.

Milani S.; Herbst H.; Schuppan D.; Grappone C.; Pellegrini G.; Pinzani M.; Casini A.; Calabro A.; Ciancio G.; Stefanini F.; Burroughs A.; Surrenti C. (1994) Differential expression of matrix metalloproteinases-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol*, 144: 528-537.

Mirabelli C.K.; Bartus H.; Bartus J.O.L.; Johnson R.; Mong S.M.; Sung C.P.; Crooke T. (1985) Application of a tissue culture microtiter test for the detection of cytotoxic agents from natural products. *J Antibiot*, 38: 758-766.

Miyaishi O.; Sakata K.; Matsuyama M.; Saga S. (1992) Distribution of the collagen binding heat-shock protein in chicken tissues. *J Histochem Cytochem*, 40: 1021-1029.

Miyata Y.; Yahara I. (1991) Cytoplasmatic 8S glucocorticoid binds to actin filaments through a heat shock protein. *J Biol Chem*, 267: 7042-7047.

Miyata Y.; Yahara I. (1992) The 90 kDa protein, HSP90, binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity. *J Biol Chem*, 266: 8779-8783.

Mizzen L.A.; Chang C.; Garrels J.I. (1989) Identification, characterization, and purification of two mammalian stress proteins present in mitochondria: one related to hsp70, the other to GroEL. *J Biol Chem*, 264: 20664-20675.

Mochan E.; Armor L.; Sporer R. (1988) Interleukin 1 stimulation of plasminogen activator production in cultured gingival fibroblasts. *J Periodont Res*, 23: 28-32.

Morino M.; Tsuzuki T.; Ishikawa Y.; Shirakami T.; Yoshimura M.; Kiyosuke Y.; Matsunaga K.; Yoshikumi C.; Saijo N. (1997) Specific expression of Hsp47 in human tumor cell lines in vitro. In vivo, 11: 17-21.

Moriyama T.; Kawada N.; Ando A.; Yamauchi A.; Horio M.; Nagata K.; Imai E.; Hori M. (1998) Up-regulation of Hsp47 in the mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. Kidney Intern, 54: 110-119.

Munro S.; Pelham H.R.B. (1986) A Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kDa glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. Cell, 46: 291-300.

Murphy G.; Ward R.; Hembry R.M.; Reynolds J.J.; Kuhn K.; Tryggvason K. (1989) Characterization of gelatinase from pig polymorphonuclear leucocytes. Biochem J, 258: 463-472.

Murphy S.P.; Gorzowski J.J.; Sarge K.D.; Phillips B. (1994) Characterization of constitutive HSF2 DNA-binding activity in mouse embryonal carcinoma cells. Mol Cell Biol 14: 5309-5317.

Nagata K. (1996) Hsp47: a collagen-specific molecular chaperone. Tibs , 21: 23-26.

Nagata K.; Hirayoshi K.; Obara M.; Saga S.; Yamada K.M. (1988) Biosynthesis of a novel transformation-sensitive heat-shock protein. J Biol Chem, 263: 8344-8349.

Nagata K.; Yamada K.M. (1986) Phosphorylation and transformation sensitivity of a major collagen-protein of chick fibroblast is a novel heat shock protein. J Biol Chem, 265: 992-999.

Nakai A.; Hirayoshi K.; Nagata K. (1990) A transformation of BALB/3T3 cells by Simian virus 40 causes a decreased synthesis of a collagen-binding heat-shock protein (Hsp47). J Biol Chem, 265: 992-999.

Nakai A.; Hirayoshi K.; Saga S.; Nagata K. (1989) The transformation-sensitive heat shock protein (Hsp47) binds specifically to fetuin. Biochem Biophys Res Commun, 164: 259-264.

Nakai A.; Morimoto R.I. (1993) Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor; heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. Mol Cell Biol, 13: 1983-1997.

Nakai A.; Satoh M.; Hirayoshi K.; Nagata K. (1992) Involvement of the stress protein Hsp47 in procollagen processing in the endoplasmic reticulum. J Cell Biol, 117: 903-914.

Nakamura T.; Fukui M.; Ebihara I.; Osada S.; Tomino Y.; Koide H. (1994) Abnormal gene expression of matrix metalloproteinases and their inhibitor in glomeruli from diabetic rats. *Renal Physiol Biochem*, 17: 316-325.

Narayanan A.S.; Meyers D.F.; Page R.C. (1988) Regulation of collagen production in fibroblasts cultured from normal and phenytoin-induced hyperplastic human gingiva. *J Periodont Res*, 23: 118-121.

Narayanan A.S.; Page R.C. (1985) Synthesis of type V collagen by fibroblasts derived from normal, inflamed and hyperplastic human connective tissues. *Collagen Rel Res*, 5: 297-304.

Nassova I.; Kotra L.P.; Fridman R.; Mobashery S. (1998) Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J*, 12: 1075-1095.

Natsume T.; Koide T.; Yokota S.; Hirayoshi K.; Nagata K. (1994) Interactions between collagen-binding stress protein Hsp47 and collagen. *J Biol Chem*, 269: 31224-31228.

Needleman B.W.; Choi J.; Burrows-Mezu A.; Fontana J.A. (1990) Secretion and binding of transforming growth factor β by scleroderma and normal dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 33: 650-656.

Nicchitta C.V.; Migliaccio G.; Blobel G. (1991) Biochemical fractionation and assembly of the membrane components that mediate nascent chain targeting and translocation. *Cell*, 65: 587-598.

Nicholson M.L.; Bicknell G.R.; Williams S.T.; Furness P.N. (1998) Is TGF-beta an profibrotic cytokine in human renal transplants? *Transplant Proc*, 30: 952.

Nosman T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immun Meth*, 65: 55-63.

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

Okada H.; Murakami S. (1998) Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9: 248-266.

Okada Y.; Naka K.; Kawamura K.; Matsumoto T.; Nakanishi I.; Fujimoto N.; Sato H.; Seiki M. (1995) Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase=gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Laboratory Inv*, 72: 311-322.

Oliver M.H.; Harrison N.K.; Bishop J.E.; Cole P.J.; Laurent G.J. (1989) A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: application for assessment of growth factors. *J Cell Sci*, 92: 513-518.

Oshiro Y.; Fukuda T.; Tsuneyoshi M. (1994) Fibrosarcoma versus fibromatoses and cellular nodular fasciitis. A comparative study of their proliferative activity using proliferating cell nuclear antigen, DNA flow cytometry, and p53. *Am J Surg Pathol*, 18: 712-719.

Overall C.M.; Wrana J.L.; Sudek J. (1989a) Induction of formative and resorptive cellular phenotypes in human gingival fibroblasts by TGF- β 1 and concanavalin A; regulation of matrix metalloproteinases and TIMP. *J Periodont Res*, 26: 279-282.

Overall C.M.; Wrana J.L.; Sudek J. (1989b) Independent regulation of collagenase, 72 kDa progelatinase, and metalloproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, 264: 1860-1869.

Paglia L.; Wilczek J.; De Leon L.D.; Martin G.R.; Horlein D.; Muller P. (1979) Inhibition of procollagen cell-free synthesis by amino-terminal extension peptides. *Biochemistry*, 18: 5030-5034.

Parkar M.; Tabona P.; Newman H.; Olsen I. (1998) IL-6 Expression by oral fibroblasts is regulated by androgen. *Cytokine*, 10: 613-619.

Parsell D.A.; Kowal A.S.; Singer M.A.; Lindquist S. (1994) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature*, 372: 475-478.

Pearse B.N.; Robinson M.S. (1990) Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu Rev Cell Biol*, 6: 151-177.

Pelhan H.R.B. (1989) Control of protein exit from the ER. *Annu Rev Cell Biol*, 5: 1-23.

Pelhan H.R.B. (1994) About turn for the COPs? *Cell*, 79: 1125-1127.

Perisic O.; Xiao H.; Lis J.T. (1989) Stable binding of Drosophila heat shock factor to head-to-head and tail-to-tail repeats of a conserved 5 bp recognition unit. *Cell*, 59: 797-806.

Peters C.A.; Freeman M.R.; Fernandez C.A.; Shepard J.; Wiederschain D.G.; Moses M.A. (1997) Dysregulated proteolytic balance as the basis of excess extracellular matrix in fibrotic disease. *Am j Physiol* 272: R1960-R1965.

Peters H.; Border W.A.; Noble N.A. (1998) Targeting TGF-beta overexpression in renal disease: maximizing the antifibrotic action of angiotensin II blockade. *Kidney Int*, 54: 1570-1580.

- Phillips G.J.; Silhavy T.J. (1990) Heat-shock proteins DnaK and GroEL facilitate export of LacZ hybrid proteins in *E. coli*. *Nature*, 344: 882-884.
- Phipps R.P.; Borrello M.A.; Blieden T.M. (1997) Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. *J Periodont Res*, 32: 159-165.
- Picard D.; Salser S.J.; Yamamoto K.R. (1988) A moveable and regulable inactivation function within the steroid-binding domain of the glucocorticoid receptor. *Cell*, 54: 1073-1079.
- Piguet P.F.; Collart M.A.; Grau G.E.; et al. (1989) TNF/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis. *J Exp Med*, 170: 655-663.
- Piguet P.F.; Vesin C. (1994) Treatment by human recombinant soluble TNF receptor of pulmonary fibrosis induced by bleomycin or silica in mice. *Eur Respir J*, 7: 515-518.
- Pihlajaniemi T.; Helaakoski T.; Tasanen K.; Myllyla R.; Huhtala M.L.; Koivu J.; Kivirikko K.I. (1987) Molecular cloning of the beta-subunit of human prolyl 4-hydroxylase. This subunit and protein disulphide isomerase are products of the same gene. *EMBO J*, 6: 643-649.
- Pratt W.B.; Czar M.J.; Stancato L.F.; Owens J.K. (1993) The Hsp56 immunophilin component of steroid receptor heterocomplexes: could this be the elusive nuclear localization signal-binding protein? *J Steroid Biochem Mol Biol*, 46: 269-279.
- Raghow R.; Postlethwaite A.E.; Keski-Oja J.; Moses H.L.; Hang A.H. (1987) Transforming growth factor-beta increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *J Clin Invest*, 79: 1285-1288.
- Rameshwar P.; Chang V.T.; Thacker U.F.; Gascon P. (1998) Systemic transforming growth factor-beta in patients with bone marrow fibrosis—pathophysiological implications. *Am J Hematol*, 59: 133-142.
- Razzaque M.S.; Hossain M.A.; Kohno S.; Taguchi T. (1998a) Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rat is associated with increased expression of collagen binding heat shock protein (Hsp) 47. *Virchows Arch*, 432: 455-460.
- Razzaque M.S.; Kumatori A.; Harada T.; Taguchi T. (1998c) Coexpression of collagens and collagen-binding heat shock protein 47 in human diabetic nephropathy and IgA nephropathy. *Nephron*, 80: 434-443.

Razzaque M.S.; Shimokawa I.; Nazneen A.; Higami Y.; Taguchi T. (1998b) Age-related nephropathy in the Fischer 344 is associated with overexpression of collagens and collagen-binding heat shock protein 47. *Cell Tissue Res*, 293: 471-478.

Razzaque M.S.; Taguchi T. (1997) Collagen-binding heat shock protein (Hsp) 47 expression in anti-thymocyte serum (ATS)- induced glomerulonephritis. *J Pathol*, 183: 24-29.

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. (1999) *Oral Pathology: clinical pathologic correlations*, 3rd ed.

Reinhardt R.A.; Masada M.P.; Kaldahl W.B.; DuBois L.M.; Kornman K.S.; Choi J-I.; Kalkwarf K.L.; Allison A. C. (1993) Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol*, 20: 225-231.

Reponen P.; Sahlberg C.; Huhtala P.; Hurskainen T.; Thesleff I.; Tryggvason K. (1992) Molecular cloning of murine 72-kDa type IV collagenase and its expression during mouse development. *J Bio Chem*, 267: 7856-7862.

Reponen P.; Sahlberg C.; Munaut C.; Thesleff I.; Tryggvason K. (1994) High expression of 92- kDa type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *J Cell Biol*, 124: 1091-1102.

Ritossa F. (1962) Chromosome puffing in *Drosophila* after exposure to heat. *Experientia*, 18: 571-573.

Ro J.Y.; El-Naggar A.K.; Amin M.B.; Sahin A.A.; Ordonez N.G.; Ayala A.G. (1993) Pseudosarcomatous fibromyxoid tumor of the urinary bladder and prostate: immunohistochemical, ultrastructural, and DNA flow cytometric analyses of nine cases. *Hum Pathol*, 24: 1203-1210.

Roberts A.B.; Anzano M.A.; Lamb L.C.; Smith J.M.; Sporn M.B. (1981) New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78: 5339-5343.

Rothman J.E. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, 372: 55-63.

Rutherford S.L.; Zuker C.S. (1994) Protein folding and the regulation of signaling pathways. *Cell*, 79: 1129-1132.

Saga S.; Nagata S.; Chen W.T.; Yamada K.M. (1987) pH-dependent function, purification, and intracellular location of a major collagen-binding glycoprotein. *J Cell Biol*, 105: 517-527.

Salo T.; Oikarinen K.S.; Oikarinen A.I. (1990) Effect of phenytoin and nifedipine on collagen gene expression in human gingiva fibroblasts. *J Oral Pathol Med*, 19: 404-407.

Sanchez E.R.; Housley P.R.; Pratt W.B. (1986) The molybdate-stabilized glucocorticoid binding complex of I-cells contains a 98-100 kDa steroid binding phosphoprotein and 90 kDa nonsteroid-binding phosphoprotein that is part of the murine heat-shock complex. *J Steroid Biochem*, 24: 9-18.

Sato H.; Takino T.; Okada Y.; Cao J.; Shinejawa A.; Yamamoto E.; Seiki M. (1994) A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature*, 370: 61-65.

Satoh M.; Hirayoshi K.; Yokota S.; Hosokawa N.; Nagata K. (1996) Intracellular interaction of collagen-specific stress protein Hsp47 with newly synthesized procollagen. *J Cell Biol*, 133: 469-483.

Sauk J.J.; Craig L.; Van Kampen C.L.; Norris K.; Foster R.; Somerman M.J. (1990b) Expression of constitutive and inducible Hsp70 and Hsp47 is enhanced in cells persistently spread on OPNI or collagen. *Biochem Biophys Res Commun*, 172: 135-142.

Sauk J.J.; Norris K.; Hebert C.; Ordonez J.; Reynolds M. (1998) Hsp47 binds to the KDEL receptor and cell surface expression is modulated by cytoplasmic and endosomal pH. *Conn Tis Res*, 37: 105-119.

Sauk J.J.; Norris K.; Moehring J.; Foster R.A.; Somerman M.J. (1990a) The expression of colligin/Hsp47 after stress in human periodontal fibroblast in vitro. *Arch Oral Biol*, 35: 645-651.

Sauk J.J.; Smith T.; Norris K.; Ferreira L. (1994) Hsp47 and the translation-translocation machinery cooperate in the production of $\alpha 1(I)$ chains of type I procollagen. *J Biol Chem*, 269: 3941-3946.

Schlenstedt G.; Harris S.; Risse B.; Lill R.; Silver P.A. (1995) A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with BiP/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. *J Cell Biol*, 129: 979-988.

Schlesinger M.J. (1986) Heat shock proteins: the search for functions. *J Cell Biol*, 103: 321-325.

Schuetz T.J.; Gallo G.J.; Sheldon L.; Tempst P.; Kingston R.E. (1991) Isolation of a cDNA for HSF2: evidence for two heat shock factor genes in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 6911-6915.

Sens D.A.; McGuirt J.P.; Khan W.; Howel R.M.; Todd J.H. (1997) Expression of Hsc 70, but not Hsp 70, in human third molar dental pulp. *Eur J Oral Sci*, 105: 271-277.

Sens D.A.; McGuirt J.P.; Khan W.; Todd J.H.; Howel R.M. (1996) Expression of heat shock protein 27 in adult human third molar dental pulp. *J Oral Pathol Med*, 25: 382-387.

Shapiro S.D.; Kobayashi D.K.; Ley T.J. (1993) Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem*, 268: 23824-23829.

Sheffield W.P.; Shore G.C.; Randall S.K. (1990) Mitochondrial precursor protein. *J Biol Chem* 265: 11069-11076.

Shi Y.; Thomas J.O. (1992) The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol*, 12: 2186-2192.

Shin G.T.; Khanna A.; Ding R.; Sharma V.K.; Lagman M.; Li B.; Suthanthiran M. (1998) In vivo expression of transforming growth factor beta-1 in humans: stimulation by cyclosporine. *Transplantation*, 65: 313-318.

Shirasuna K.; Okura 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.; Orbegoso R.; Norris K.; Ferreira L.; Sauk J.J. (1994b) Hsp47 is associated with heterotrimeric procollagen I production/expression during molar eruption. The biological mechanisms of tooth eruption, resorption and replacement by implants, ed. by Davodovich, 391-394.

Shroff B.; Pileggi R.; Norris K.; Orbegoso R.; Wilson T.; Sauk J.J. (1994a) Dynamic variations in the expression of type I collagen and its molecular chaperone Hsp47 in cells of the mouse dental follicle during tooth eruption. *Archs Oral Biol*, 39: 231-243.

Shroff B.; Smith T.; Norris K.; Pileggi R.; Sauk J.J. (1993) Hsp47 is localized to regions of type I collagen production in developing murine femurs and molars. *Conn Tis Res*, 29: 273-286.

Sibalic V.; Sun L.; Sibalic A.; Oertli B.; Titthaler T.; Wuthrich R.P. (1998) Characteristics matrix and tubular basement membrane abnormalities in the CBA/Ca-kdkd mouse model of hereditary tubulointerstitial disease. *Nephron*, 80: 305-313.

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

Sistonen L.; Sarge K.D.; Morimoto R.I. (1994) Human heat shock factor 1 and 2 are differentially activated and can synergistically induce hsp 70 gene transcription. *Mol Cell Biol*, 14: 2087-2099.

Skowrya D.; Georgopoulos C.; Zylicz M. (1990) The *E. coli* Dnak gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell*, 62: 939-944.

Smith T.; Ferreira L.R.; Hebert C.; Norris K.; Sauk J.J. (1995) Hsp47 and cyclophilin B traverse the endoplasmatic reticulum with procollagen into pre-golgi intermediate vesicles. *J Biol Chem*, 270: 18323-18328.

Solis-Herruzo, J.A.; Brenner D.A.; Chojkier M. (1988) Tumor necrosis factor- α inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem*, 263: 5841-5845.

Sorger P.K. (1990) Yeast heat shock factor contains separable transient and sustained response transcriptional activators. *Cell*, 62: 793-805.

Sorger P.K. (1991) Heat shock factor and the heat shock response. *Cell*, 65: 363-366.

Sorger P.K.; Pelhan H.R.B. (1987) The glucose-regulated protein Grp94 is related to heat shock protein Hsp90. *J Mol Biol*, 194: 341-344.

Souza S.J. de; Pacheco M.M.; Sonohara S.; Brentani M.M.; Brentani R.R. (1993) Regulation of extracellular matrix-degrading proteases. *Ciência e Cultura*, 45: 313-318.

Sporn M.B.; Roberts A.B.; Wakefield L.M.; Crombrugghe B. (1987) Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor- β . *J Cell Biol*, 195: 1039-1045.

Strickland S.; Mahdavi V. (1978) The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell*, 15: 393-403.

Sunamoto M.; Kuze K.; Tsuji H.; Ohishi N.; Yagi K.; Nagata K.; Kita T.; Doi T. (1998b) Antisense oligonucleotides against collagen-binding stress protein Hsp47 suppress collagen accumulation in experimental glomerulonephritis. *Lab Invest*, 78: 967-972.

Sunamoto M.; Kuze K.; Iehara N.; Takeoka H.; Nagata K.; Kita T.; Doi T. (1998a) Expression of heat shock protein 47 is increased in remnant kidney and correlates with disease progression. *J Exp Path*, 79:133-140.

Suzuki Y. Nishikaku F.; Nakatuka M.; Koga Y. (1998) Osteoclast-like cells in murine collagen induced arthritis. *J Rheumatol*, 25:1154-1160.

Sykes B.; Puddle B.; Francis M.; Smith R. (1976) The estimation of two collagens from human dermis by interrupted gel electrophoresis. *Biochem Bioph Res Comm*, 72: 1472-1480.

Takagi M.; Yamamoto H.; Mega H.; Hsieh K.J.; Shioda S. (1991) Heterogeneity in gingival fibromatosis. *Cancer*, 68: 2202-2212.

Takechi H.; Hirayoshi K.; Nakai A.; Kudo H.; Saga S.; Nagata K. (1992) Molecular cloning of a mouse 47-kDa heat-shock protein (Hsp47), a collagen-binding stress protein, and its expression during the differentiation of F9 teratocarcinoma cells. *Eur J Biochem* 200: 323-329.

Takechi H.; Hosokawa N.; Hirayoshi K.; Nagata K. (1994) Alternative 5' splice site selection induced by heat shock. *Mol Cell Biol*, 14: 567-575.

Takemoto H.; Yashimori T.; Yamamoto A.; Myata Y.; Yahara I.; Inoue K.; Tashiro Y. (1992) Heavy chain binding protein (BIP/Grp78) and endoplasmic reticulum chaperonin are exported from endoplasmic reticulum in rat exocrine cells similar to protein disulfide-isomerase. *Arch Biochem Biophys*, 296: 129-136.

Takemura H.; Suzuki H.; Fujisawa H.; Yuasa T.; Akama T.; Yamane K.; Kashiwagi H. (1998) Enhanced interleukin 6 production by cultured fibroblasts from patients with systemic sclerosis in response to platelet derived growth factor. *J Rheumatol*, 25: 1534-1539.

Takigawa M.; Takashiba S.; Takahashi K.; Arai H.; Kurihara H.; Murayama Y. (1994) Prostaglandin E2 inhibits interleukin-6 release but not its transcription in human gingival fibroblasts stimulated with interleukin-1 beta or tumor necrosis factor-alpha. *J Periodontol*, 65: 1122-1127.

Takino T.; Sato H.; Shinejawa A.; Seiki M. (1995) Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane type class in the MMP family. *J Biol Chem*, 270: 23013-23020.

Tamura Y.; Peng P.; Liu K.; Daou M.; Srivastava P.K. (1997) Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science*, 278: 117-120.

- Tatakis D.N. (1993) Interleukin-1 bone metabolism. A review. *J Periodontol* 64: 416-431.
- Thompson K.; Holliday R. (1983) Genetic effects on the longevity of cultured human fibroblasts. IV. Enhanced growth potential of cystic fibrosis cells. *Gerontology*, 29: 97-101.
- Thompson M.W.; McInnes R.R.; Willard H.F. (1993), Thompson & Thompson genética médica, 5º ed., 339p.
- Timpl R. (1989) Structure and biological activity of basement membrane. *Eur J Biochem*, 180: 487-502.
- Tissieres A.; Mitchell H. K.; Tracy U.M. (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*, 84: 389-398.
- Thomason J.M.; Sloan P.; Seymour R.A. (1998) immunolocalization of collagenase (MMP-1) and stromelysin (MMP-3) in the gingival tissues of organ transplant patients medicated with cyclosporin. *J Clin Periodontol*, 25: 554-560.
- Trere D.; Pession A.; Derentzini M. (1989) The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. *Exp Cell Res*, 184: 131-137.
- Trere D.; Pession A.; Derentzini M. (1989) The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. *Exp Cell Res*, 184:131-137.
- Tipton 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.
- Tipton D.A; Dabbous M.Kh. (1998) Autocrine transforming growth factor β stimulation of extracellular matrix production by fibroblasts from fibrotic human gingiva. *J Periodontol*, 69: 609-619.
- Tucker R.F.; Volkenant M.E.; Branum E.L.; Moses H.L. (1983) Comparison of intra and extracellular transforming growth factor from non-transformed and chemically transformed mouse embryo cells. *Cancer Res*, 43: 1581-1586.
- Uitto J.; Peredja A.J.; Abergel R.P.; Chu M.L.; Ramirez F. (1985) Altered steady-state ratio of type I/III procollagen mRNAs correlates with selectively increased type I collagen biosynthesis in cultured keloid fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 5935-5939.

- Unodo H.; Levey D.L.; Srivastava P.K. (1994) Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: tumor rejection antigen gp96 primes CD8+ T cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 3077-3081.
- Van Wart H.E.; Birkedal-Hansen H. (1990) The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinases activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 5578-5582.
- Vernillo A.T.; Schwartz N.B. (1987) The effects of phenytoin (5,5-diphenylhydantoin) on human gingival fibroblasts in culture. *J Periodont Res*, 22: 307-312.
- Verrico A.K.; Moore J.V. (1997) Expression of the collagen-related heat shock protein Hsp47 in fibroblasts treated with hyperthermia or photodynamic. *Brit J Cancer*, 76: 719-724.
- Vijaykumar M.B.; Brott D.A.; Qiu L.; Conroy M.C.; Lalwani N.D. (1995) Immunofluorescence quantitation of stromelysin in human synovial fibroblasts by confocal laser scanning microscopy. *Lab Invest*, 72: 484-490.
- Vuorio T.; Kahari V.-M.; Black C.; Vuorio E. (1991) Expression of osteonectin, decorin, and transforming growth factor β 1 genes in fibroblasts cultured from patients with systemic sclerosis and morphea. *J Rheumatol*, 18: 247-251.
- Walton P.A.; Wendland M.; Subramani S.; Rachubinski R.A.; Welch W.J. (1994) Involvement of 70-kD heat-shock proteins in peroxisomal import. *J Cell Biol*, 125: 1037-1046.
- Wang S.Y. (1994) A retinoic acid-inducible GATA-binding protein binds to the regulatory region of J6 serpin gene. *J Biol Chem*, 269: 607-613.
- Wang S.Y.; Gudas L.J. (1990) A retinoic acid inducible mRNA from F9 teratocarcinoma cells encodes a novel protease inhibitor homologue. *J Biol Chem*, 265: 15818-15822.
- Watowich S.S.; Marimoto R.I. (1988) Complex regulation of heat shock and glucose-responsive genes in human cells. *Mol Cell Biol*, 8: 393-405.
- Webster D.F.; Harvey W. (1979) A quantitative assay for collagen synthesis in microwell fibroblast cultures. *Anal Biochem*, 96: 220-224.
- Weeks J.G.; Halme J.; Woessner J.F.Jr. (1976) Extraction of collagenase from the involuting rat uterus. *Biochem Biophys Acta*, 445: 205-214.

- Welch W.J.; Feramisco J.R. (1985) Rapid purification of mammalian 70,000 dalton stress proteins: affinity of the proteins for nucleotides. *Mol Cell Biol* 5: 1229-1237.
- Welgus H.G.; Fliszar C.J.; Seltzer J.L.; Schmid T.M.; Jeffrey J.J. (1990) Differential susceptibility of type IV collagen to cleavage by two mammalian interstitial collagenases and 72-kDa type IV collagenase. *J Biol Chem*, 265: 13521-13527.
- Werner-Washburne M.; Stone D.E.; Craig E.A. (1987) Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 7: 2568-2577.
- Wiech H.; Buchner J.; Zimmermann R.; Jakob U. (1992) Hsp90 chaperones protein folding in vitro. *Nature*, 358: 169-170.
- Will H.; Hinzmann B. (1995) cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. *Eur J Biochem*, 231: 602-608.
- Woessner J.F.Jr. (1994) The family of matrix metalloproteinases. In *Inhibition of matrix metalloproteinases: therapeutic potential*. Annals of the NY Academy of Sciences 732: 31-41.
- Wolin S.L. (1994) From the elephant to *E. coli*: SRP-dependent protein targeting. *Cell*, 77: 787-790.
- Wright G.M.; Leblond C.P. (1989) Immunohistochemical localization of procollagens. Type I procollagen antigenicity in osteoblasts and prebone (osteoid). *J Histochem Cytochem*, 29: 791-804.
- Wu C.H.; Donovan C.B.; Wu G.Y. (1986) Evidence for pretranslational regulation of collagen synthesis by procollagen propeptides. *J Biol Chem*, 261: 10482-10484.
- Xiao H.; Lis J.T. (1988) Germline transformation used to define key features of heat-shock response elements. *Science*, 239: 1139-1142.
- Yamamoto N.; Smith M.W.; Maki A.; Berezesky I.K.; Trump B.F. (1994) Role of cytosolic Ca²⁺ and protein kinases in the induction of the hsp 70 gene. *Kidney Int*, 45: 1093-1104.
- Yamamura I.; Hirata H.; Hosokawa N.; Nagata K. (1998) Transcriptional activation of the mouse Hsp47 gene in mouse osteoblast MC3T3-E1 Cells by TGF- β 1. *Biochem Biophys Res Commun*, 244: 68-74.
- Zimmermann R.; Sagstetter M.; Lewis M.J.; Pelham H.R.B. (1988) Seventy-kilodalton heat shock proteins and an additional component from reticulocyte lysate stimulated import of M13 procoat protein into microsomes. *EMBO J* 7: 2875-2880.

Zurita-Salinas C.S.; Richaud-Patin Y.; Krotzsch-Gomez E.; Llorente L.; Alcocer-Varela J.; Diazde-Leon L.; Palacios-Boix A. (1998) Spontaneous cytokine gene expression by cultured skin fibroblasts of systemic sclerosis. Correlation with collagen synthesis. *Rev Invest Clin*, 50: 97-104.