



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA ODONTOLÓGICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

GUILHERME COSTA SOARES

**PAPEL DO COLÁGENO E DA IMUNOMODULAÇÃO POR TGF- β NOS ACHADOS
CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS EM GRANULOMAS PIOGÊNICOS E FIBROMAS
OSSIFICANTES PERIFÉRICOS**

FORTALEZA

2018

GUILHERME COSTA SOARES

PAPEL DO COLÁGENO E DA IMUNOMODULAÇÃO POR TGF- β NOS ACHADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS EM GRANULOMAS PIOGÊNICOS E FIBROMAS OSSIFICANTES PERIFÉRICOS

Trabalho de conclusão de curso submetido à coordenação do curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de bacharel em Odontologia.

Área de concentração: Patologia Bucodental

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S654p Soares, Guilherme Costa

Papel do colágeno e da imunomodulação por TGF-beta nos achados clínicos e microscópicos em granulomas piogênicos e fibromas ossificantes periféricos / Guilherme Costa Soares. – 2018.
27f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Odontologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.

1. granuloma piogênico. 2. fibroma ossificante periférico. 3. colágeno. 4. fator de crescimento transformante beta. I. Título.

CDD 617.6

GUILHERME COSTA SOARES

PAPEL DO COLÁGENO E DA IMUNOMODULAÇÃO POR TGF- β NOS ACHADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS EM GRANULOMAS PIOGÊNCOS E FIBROMAS OSSIFICANTES PERIFÉRICOS

Trabalho de conclusão de curso submetido à coordenação do curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de bacharel em Odontologia. Área de concentração: Patologia Bucodental

Aprovado em: 11 / 12 / 2018.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À DEUS, primeiramente, por toda a força, proteção e ajuda que me proporcionou por todos esses anos.

Aos meus pais, que, durante esses anos de faculdade, me ajudaram de todas as formas possíveis, principalmente me estimulando a estudar para que eu seja uma boa pessoa e um bom profissional no futuro. Devo tudo a eles.

À minha família, por todo o companheirismo e estímulo prestados. Sempre estiveram do meu lado no que eu precisasse.

Aos meus colegas de turma, que estiveram comigo durante todos esses anos. Sabemos o quanto foi difícil chegar até aqui, mas, ajudando uns aos outros, crescemos como pessoa e como profissional. Sempre falo que aprendemos muito uns com os outros.

À minha dupla, Leonardo, por toda ajuda durante esses anos de faculdade. Trocamos muitos conhecimentos.

Faço um agradecimento especial à minha eterna dupla, Olavo, que, agora, está cursando medicina. Uma pessoa magnífica, que admiro extremamente! Sempre que nos encontramos, são muitas brincadeiras e risadas! Muito obrigado por tudo, meu amigo médico!

Aos meus professores queridos, por toda a paciência e conhecimento que nos repassaram. Com certeza, lembraremos de todos pro resto da vida. Agradeço, especialmente, aos meus queridos orientadores, Profa. Dra. Ana Paula, Prof. Dr. Mário Mota, Prof. Dr. Fabrício Bitu e Prof. Dr. Paulo Goberlânio (Paulinho), por terem me acolhido da melhor forma possível na disciplina de Patologia. Mais do que uma relação de trabalho, temos uma relação de amizade e muito respeito. Sou eternamente grato por todo o auxílio e conhecimento que vocês me repassaram. Por isso escolhi seguir essa área, que tanto amo.

Aos funcionários da UFC, especialmente o Nunes, por tornar o ambiente clínico mais leve e descontraído. Sempre lembrarei das brincadeiras durante os atendimentos. Não tenho dúvidas de que ganhei um grande amigo nessa faculdade. Obrigado Nunes!

Agradeço, também, aos meus orientadores nos estágios, especialmente ao Dr. Lúcio Hélio, do Hospital São José, e ao Dr. Vitor, do crutac de Icapuí, por compartilharem de todas suas experiências clínicas. O mês de junho e de setembro de 2018, no qual fiz estágio no crutac e no referido Hospital, respectivamente, foram bastante especiais e engrandecedores pra mim.

RESUMO

Fibroblastos, colágeno e o Fator de crescimento transformante beta (TGF- β) são componentes importantes no Granuloma Piogênico (GP) e no Fibroma Ossificante Periférico (FOP), executando funções diferentes nessas lesões. O objetivo desse estudo foi avaliar o papel do colágeno e da imunomodulação pelo Fator de crescimento transformante beta (TGF- β) nos achados clínicos e microscópicos de GP e FOP.

GP (n=20) e FOP (n=20) foram selecionados para avaliação clínica (sexo, idade, localização, tamanho e tempo de evolução) e análise microscópica (coloração através de Picrosirius Red para análise do colágeno através de luz polarizada e imunistoquímica para TGF- β) realizadas em áreas superficiais e profundas das duas lesões. ANOVA/Bonferroni e teste-t, correlação de Pearson e χ^2 foram utilizados para comparar e correlacionar os parâmetros analisados. (p<0.05, GraphPad Prism 5.0).

A profundidade do GP apresentou uma maior quantidade de colágeno em relação a sua superfície (p<0,001), e sua superfície mostrou uma menor quantidade de colágeno tipo I (birrefringência amarelo-avermelhada) quando comparados a sua profundidade, superfície e profundidade do FOP (p<0,001). O número de células positivas para TGF- β foi menor na superfície do GP quando comparado com a sua profundidade e com superfície e profundidade do FOP (p<0,001). Sexo e localização não afetaram esses parâmetros, mas o perfil de colágeno e a imunomarcagem para TGF- β foram modificados pelo tempo de evolução e pelo tamanho das lesões. Embora GP e FOP sejam lesões gengivais reativas, a expressão de TGF- β e o papel do colágeno evidenciaram comportamentos biológicos diferentes nessas lesões, sugerindo origens biológicas diferentes para seus componentes.

Palavras-chave: Granuloma Piogênico. Fibroma Ossificante Periférico. Colágeno. Fator de Crescimento Transformante Beta.

ABSTRACT

Background: Collagen is a component of Pyogenic Granuloma (PG) and Peripheral Ossifying Fibroma (POF) and performs different functions in these lesions. The objective of this study is to evaluate the role of collagen and immunostaining for Transforming Growth Factor beta (TGF- β) in the clinical and microscopic findings of PG and POF.

Methods: PG (n=20) and POF (n=20) were selected for clinical evaluation (sex, age, localization, size and evolution time) and microscopic analysis (picrosirius red staining for collagen analysis and immunohistochemistry for TGF- β) performed in the superficial and deep areas of the two lesions. ANOVA/Bonferroni and t-test, Pearson correlation and χ^2 were used to compare the sites and parameters analyzed ($p < 0.05$, GraphPad Prism 5.0).

Results: The depth of PG presented the highest amount of collagen ($p < 0.001$), and its surface showed the lowest amount of type 1 collagen (yellow-red strong birefringence). Type 1 collagen gradually increased in depth of PG, surface and depth of POF ($p < 0.001$). The number of TGF- β + cells was lower on the surface of PG compared with the depth of PG and the two areas of POF ($p < 0.001$). Sex and localization did not affect these parameters, but the profile of collagen and immunostaining for TGF- β suffered from modifications by the time of evolution and the size of the lesion.

Conclusions: Although PG and POF are reactive gingival lesions, the expression of TGF- β and its role in collagen showed different biological behaviors in these lesions, suggesting different biological origins for its components.

Keywords: Pyogenic Granuloma, Peripheral Ossifying Fibroma, Collagen, Transforming Growth Factor beta.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Perfil histológico, histoquímico e imunoistoquímico em áreas superficiais e profundas dos casos de GP e FOP	18
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas dos casos de GP e FOP	17
Tabela 2 – Efeitos do sexo, presença nos ossos gnáticos e localização nos achados histológicos dos casos de GP e FOP	20
Tabela 3 – Características clínicas dos casos de GP e FOP	21
Tabela 4 – Correlação entre imunomarcção para TGF- β e perfil de colágeno nos casos de GP e FOP	22

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1	Considerações éticas	13
2.2	Cálculo amostral	13
2.3	Tipo de estudo e caracterização das amostras	13
2.4	Análise histoquímica	13
2.5	Análise imunoistoquímica	14
2.6	Análise microscópica: análise da densidade óptica das fibras de colágeno	14
2.7	Análise microscópica: análise da densidade óptica das fibras de colágeno em luz polarizada	15
2.8	Análise microscópica: imunomarcção para TGF-β	15
2.9	Análise estatística	15
3	RESULTADOS	16
3.1	Caracterização da amostra	16
3.2	Caracterização microscópica de GP e FOP	16
3.3	Perfil do colágeno em GP e FOP	17
3.4	Imunomarcção para TGF-β em GP e FOP	18
3.5	Correlação clínico-patológica e microscópica entre o perfil de colágeno e imunomarcção para TGF-β em diferentes áreas de GP e FOP	19
4	DISCUSSÃO	23
	REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

A proximidade da gengiva com a mucosa alveolar, ligamento periodontal, dente e osso alveolar propicia que esse sítio anatômico tenha um maior risco para o desenvolvimento de lesões específicas e inespecíficas. Esse atributo confere uma maior dificuldade na compreensão de lesões gengivais.¹ Levantamentos epidemiológicos de lesões gengivais são frequentemente executados,²⁻⁴ porém as metodologias empregadas concentram-se em documentos e registros médicos, tornando-se difícil criar hipóteses para os mecanismos de patogênese das diferentes lesões.

As lesões mais frequentes em gengiva são reativas, e, apesar das pequenas variações, o Granuloma Piogênico (GP) e o Fibroma Ossificante Periférico (FOP) são os mais comuns.^{1,4-6} Essas duas lesões apresentam caráter não-neoplásico, possuem crescimento nodular, podem atingir grandes tamanhos e são causadas por traumas crônicos e baixa intensidade, doença periodontal e biofilme dental.^{1,7-9}

No entanto, enquanto o GP exhibe sangramento frequente,¹⁰ o FOP apresenta uma profundidade dura e crepitante.¹¹ O GP apresenta uma intensa proliferação vascular e inflamação crônica,⁴ enquanto o FOP caracteriza-se pela proliferação de fibroblastos associado a um material mineralizado (osso, material cementoide ou calcificação distrófica).^{12,13} Além disso, o GP pode ser encontrado em outras localidades orais,¹⁴ já o FOP localiza-se exclusivamente na gengiva.¹¹

Propõe-se que GP e FOP tenham origens celulares distintas,¹¹ e o papel do colágeno e de citocinas envolvidas no desenvolvimento e maturação dessas lesões podem ajudar a explicar essa teoria. O TGF- β é uma citocina que está fortemente associada à produção e maturação do colágeno,¹⁵ que é um importante componente nas duas lesões. A superprodução de TGF- β pode levar a um crescimento tecidual,¹⁶ proliferação vascular,¹⁷ formação óssea e colagênese,¹⁸ o que tem sido demonstrado tanto em GP como em FOP.¹³

TGF- β é um importante bioestimulador da síntese de colágeno, mas sua atividade é modificada na presença de inflamação (presente no GP).¹⁹ No entanto, a maturação de GP ocorre paralelamente a uma diminuição da inflamação,¹ que é necessária para a maturação óssea,¹⁸ sustentando o fato de que GP não evolui para um FOP.

Vale ressaltar que existem poucos estudos na literatura que buscam correlacionar o papel do colágeno e da imunomarcagem para TGF- β com os parâmetros clínicos e microscópicos de GP e FOP.

A compreensão do papel do TGF- β no perfil de colágeno dessas duas lesões pode

auxiliar no entendimento de suas etiopatogenias. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o papel do colágeno e da imunomarcação para TGF- β nos achados clínicos e microscópicos de GP e FOP.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Considerações éticas

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal do Ceará (protocolo nº 1.799.024).

2.2 Cálculo amostral

Baseado na diferença de prevalência de sangramento entre GP (92,74%) e FOP (39,91%) observado em estudo epidemiológico de lesões gengivais por Zhang,⁷ foi necessária uma amostra de 20 casos por grupo ($\alpha = 0,05$; $\beta = 0,10$) (método de Fleiss com correção de continuidade).

2.3 Tipo de estudo e caracterização das amostras

Trata-se de um estudo retrospectivo, quantitativo e transversal, na qual foram selecionados 20 casos de GP e 20 casos de FOP do laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal do Ceará, sendo todos os pacientes diagnosticados e tratados no mesmo centro odontológico. Os relatos histopatológicos continham informações clínicas de sexo, idade, localização, tamanho e tempo de evolução. As lâminas histológicas foram analisadas descritivamente, e os blocos de parafina apresentavam material com quantidade e qualidade adequadas para análise histológica. Pacientes com GP extra-gengival, com mais de uma lesão de GP ou FOP, espécimes de gestantes e pacientes diagnosticados com outras lesões ou condições sistêmicas foram excluídos. FOPs ulcerados também foram excluídos.

2.4 Análise histoquímica

Lâminas foram confeccionadas através de cortes de 3 μ m dos blocos para coloração por Picrosirius Red para quantificação do colágeno. As amostras foram desparafinizadas, reidratadas e submetidas à coloração por Picrosirius Red (Scytech®) (30 min). As amostras foram banhadas em ácido clorídrico (HCl) a 5% e contra-coradas com hematoxilina de Harris por 45 segundos, seguidas de desidratação, diafanização e montagem em Enthellam®.

Seis campos da superfície e seis campos da profundidade foram selecionados previamente de GP e FOP e fotografados utilizando um microscópio (DM2000, Leica®) acoplado a uma câmera (DFC295, Leica®), através de um software Leica Application Suite (LAS, Leica®), em um aumento de 200x para análise do colágeno. As fotomicrografias para análise do colágeno foram realizadas em luz convencional e polarizada.³¹

2.5 Análise imunoistoquímica

Cortes de 3 μm das amostras foram colocadas em lâminas silanizadas e processadas. As amostras foram desparafinizadas, reidratadas e submetidas à recuperação antigênica utilizando um tampão de citrato (pH 6,0) em calor (95°C) por 30 minutos. Para bloqueio da peroxidase endógena, os espécimes foram incubados por 30 minutos com peróxido de hidrogênio (H₂O₂ – 3%) em solução tampão de fosfato (PBS), e, em seguida, incubados com anticorpo primário anti-TGF- β (1:400, Abcam®) *overnight*. Após lavagem em PBS, as amostras foram incubadas em anticorpo secundário Histofine (Nicherei®) por 60 minutos, seguidas para revelação com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) durante 5 minutos e contra-coradas através de hematoxilina de Harris (10 segundos). Assim, as amostras foram desidratadas, diafanizadas e montadas em Enthellam®. Um nódulo linfático humano foi utilizado como controle positivo da reação. Como controle negativo, omitiu-se o anticorpo primário.

Seis campos da superfície e seis campos da profundidade foram selecionados previamente de GP e FOP e fotografados utilizando um microscópio (DM2000, Leica®) acoplado a uma câmera (DFC295, Leica®), através de um software Leica Application Suite (LAS, Leica®), em um aumento de 400x (Área = 1.56 mm²) para quantificação das células positivas para TGF- β .

2.6 Análise microscópica: análise da densidade óptica das fibras de colágeno

As imagens obtidas de lâminas coradas por Picosirius Red através de luz convencional foram analisadas utilizando o software ImageJ® (NIH Image) através do comando Color Threshold (Image > Adjust > Color Threshold) (RGB), onde foi realizada a calibração para as cores Vermelha (mínimo: 71, máximo: 255), Verde (mínimo: 0, máximo: 69) e Azul (mínimo: 0, máximo: 92). Após calibração, as imagens foram convertidas em

escala de 8-bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary) e a área total de colágeno marcada em vermelho foi mensurada (Analyze > Analyze Particles).³¹

2.7 Análise microscópica: análise da densidade óptica das fibras de colágeno em luz polarizada

As imagens obtidas através de luz polarizada foram analisadas através do software ImageJ® (NIH Image) utilizando o mesmo comando citado anteriormente. As cores foram ajustadas através do comando Color Threshold (Image > Adjust > Color Threshold), na função RGB, para vermelho (mínimo: 0, máximo: 255), verde (mínimo: 0, máximo: 255) e azul (mínimo: 0, máximo: 32). Após a calibração, as imagens foram convertidas para a escala de 8-bit (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary), e a área total de colágeno foi medida (Analyze > Analyze Particles). Após ajuste, as imagens foram mensuradas através da porcentagem de área de colágeno marcada em amarelo-avermelhado (sugestiva de colágeno tipo I).

A área de birrefringência amarelo-avermelhada (fibras de colágeno tipo I) foi subtraída da área vermelha (fibras colágenas totais) para obtenção da área de birrefringência esverdeada (fibras de colágeno tipo III).³¹

2.8 Análise microscópica: imunomarcação para TGF- β

As imagens obtidas através de imunoistoquímica foram analisadas utilizando o software ImageJ® (NIH Image), pelo comando Cell Counter. Um operador treinado e calibrado quantificou as células positivas (marcação nuclear e citoplasmática) e negativas para TGF- β a fim de quantificar a porcentagem de células positivas.

2.9 Análise estatística

Dados quantitativos (média \pm EP) foram analisados através do teste de Kolmogorov-Smirnov e comparados utilizando ANOVA/Bonferroni, teste-t e correlação de Pearson (dados paramétricos). Os dados categóricos clínicos (n, %) foram comparados utilizando χ^2 ou teste exato de Fisher. Utilizou-se o software Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., California, USA) com 95% de confiança (p<0,05).

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização da amostra

Do total de 20 casos de GP, 13 eram mulheres (65%) e 7 eram homens (35%). Dos 20 casos de FOP, 12 (60%) eram mulheres e 8 (40%) eram homens. Não houve diferença com relação a esses parâmetros ($p=0.744$) (Tabela 1).

A maxila mostrou maior prevalência de GP ($n=14$, 70%), e foi estatisticamente diferente do FOP, que apresentou maior prevalência na mandíbula ($n=13$, 65%) ($p=0.027$). A região anterior apresentou maior prevalência de GP ($n=14$, 70%), que foi estatisticamente diferente para FOP, que demonstrou maior prevalência em região posterior ($n=15$, 75%) ($p=0.004$) (Tabela 1).

A média de idade dos pacientes com GP foi de 35.4 ± 3.8 , o que foi estatisticamente semelhante ao FOP (29.9 ± 3.4) ($p=0.325$), e a média do tempo de evolução foi semelhante nas duas lesões (7.1 ± 2.9 meses e 8.7 ± 3.0 meses, respectivamente) ($p=0.705$). No entanto, o tamanho médio do GP (1.5 ± 0.2 cm) foi significativamente menor que o FOP (2.4 ± 0.3 cm) ($p=0.016$) (Tabela 1).

3.2 Caracterização microscópica de GP e FOP

O GP evidenciou ulceração na porção superficial com infiltrado inflamatório misto constituídos por neutrófilos polimorfonucleares e células mononucleares (histiolinfoplasmocitário). Uma intensa proliferação vascular foi notada na profundidade das lesões.

No FOP, observou-se a presença de um epitélio paracراتizado, com um tecido conjuntivo denso com vasos sanguíneos maduros e raras células inflamatórias. Na profundidade do FOP, um grande número de células ovoides foram associadas com a presença de material mineralizado consistente com osso, material cementoide ou calcificação distrófica.

Tabela 1. Características clínicas dos casos de GP e FOP

	Grupo		p-Valor
	GP	FOP	
Sexo			
Feminino	13 (65%)	12 (60%)	*0.744
Masculino	7 (35%)	8 (40%)	
Presença nos ossos gnáticos			
Maxila	14 (70%)	7 (35%)	* 0.027
Mandíbula	6 (30%)	13 (65%)	
Localização			
Anterior	14 (70%)	5 (25%)	* 0.004
Posterior	6 (30%)	15 (75%)	
Idade (anos)	35.4±3.8	29.9±3.4	†0.325
Tempo de evolução (meses)	7.1±2.9	8.7±3.0	†0.705
Tamanho (cm)	1.5±0.2	2.4±0.3	† 0.016

*qui-quadrado, dados expressos em frequência absoluta e percentual;

†test t; dados expressos em média ± EP.

3.3 Perfil do colágeno em GP e FOP

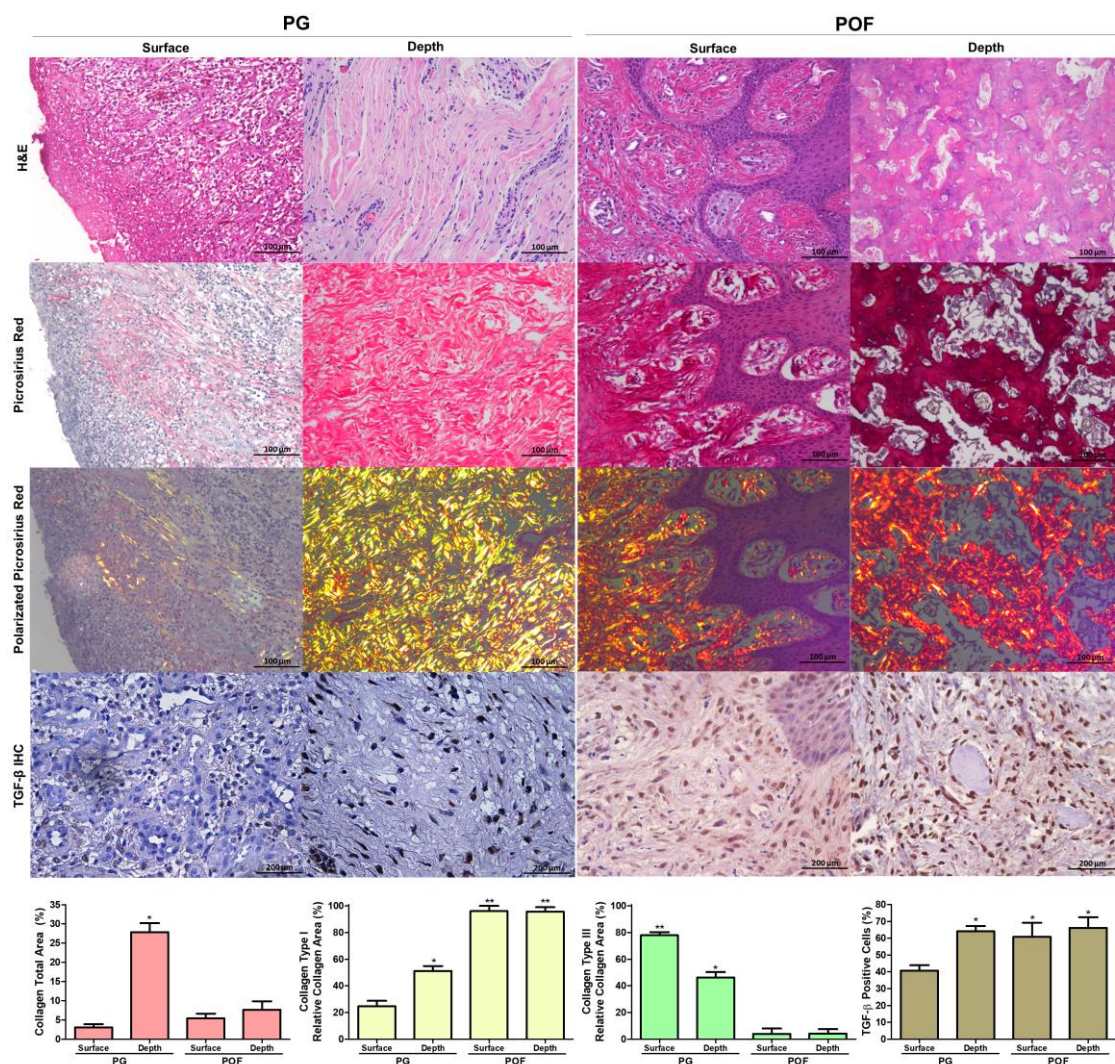
O colágeno total da área superficial de GP (3.1±0.7%) foi significativamente menor que a profundidade da mesma lesão (27.8±2.4%). Na profundidade de GP, observou-se a presença de uma maior quantidade de colágeno do que a superfície (5.4±1.2%) e profundidade do FOP (7.6±2.6%) (Figura 1).

Da área total de colágeno, a superfície de GP (24.6±4.1%) apresentou menor área de birrefringência amarelo-avermelhado (colágeno tipo I) quando comparado à profundidade da mesma lesão (51.1±3.8%). Esses valores foram significativamente menores que a superfície (96.0±4.0%) e profundidade (95.7±3.3%) do FOP (p<0.001). Em contraste com a área total de colágeno, a superfície de GP (77.9±2.3%) apresentou maior área de birrefringência esverdeada (colágeno tipo III) em relação à sua profundidade (46.4±4.1%), superfície (4.0±3.6%) e profundidade (4.3±3.3%) do FOP (p<0.001) (Figura 1).

3.4 Imunomarcção para TGF- β em GP e FOP

GP apresentou um menor número de células positivas para TGF- β em sua superfície ($40.8 \pm 3.1\%$), sendo significativamente menor que a profundidade da mesma lesão ($64.2 \pm 3.1\%$), superfície ($60.9 \pm 8.3\%$) e profundidade ($66.2 \pm 6.4\%$) do FOP ($p=0.001$) (Figura 1).

Figura 1. Perfil histológico, histoquímico e imunoistoquímico em áreas superficiais e profundas dos casos de GP e FOP



(Aumento: 200; H&E: Hematoxilina-eosina; IHC: Imunoistoquímica). A análise microscópica evidenciou intenso infiltrado inflamatório, pouco colágeno e imunomarcção para TGF- β na superfície de GP e baixa inflamação, intensa deposição de colágeno (tipo I) e imunomarcção para TGF- β na profundidade de GP. Na superfície e profundidade do FOP, baixa inflamação, níveis elevados de colágeno tipo I e imunomarcção para TGF- β foram mostrados. * $p < 0.05$ versus superfície de GP; ** $p < 0.05$ versus profundidade de GP (média \pm EP, ANOVA/Bonferroni). Fonte: Dados da pesquisa.

3.5 Correlação clínico-patológica e microscópica entre o perfil de colágeno e imunomarcção para TGF- β em diferentes áreas de GP e FOP

Sexo e localização não influenciaram significativamente o perfil de colágeno e imunomarcção para TGF- β em GP e FOP (Tabela 2). No entanto, no GP, o tempo de evolução correlacionou-se diretamente com o colágeno do tipo I (birrefringência amarelo-avermelhada) em profundidade ($p=0.042$, $r=0.422$) e inversamente correlacionado com o colágeno do tipo III (birrefringência esverdeada) na mesma região ($p=0.018$, $r=-0.583$). No FOP, o número de células positivas para TGF- β na superfície correlacionou-se diretamente com o tamanho da lesão ($p=0.028$, $r=0.972$), e a quantidade de células positivas para TGF- β na profundidade foi inversamente correlacionado com o tempo de evolução ($p=0.019$, $r=-0.887$) (Tabela 3).

No GP, o colágeno total na superfície correlacionou-se diretamente com o colágeno tipo III (birrefringência esverdeada) na superfície ($p=0.001$, $r=0.598$) e na profundidade ($p<0.001$, $r=0.682$) e inversamente com o colágeno tipo I (birrefringência amarelo-avermelhada) na superfície ($p=0.001$, $r=-0.598$) e na profundidade ($p<0.001$, $r=-0.682$). Colágeno do tipo I e III correlacionaram-se inversamente em ambas as regiões ($p < 0,001$, $r = 1,000$). Imunomarcção para TGF- β não evidenciou qualquer correlação com o perfil de colágeno em GP (Tabela 4).

No FOP, o colágeno total na superfície mostrou uma correlação direta com o colágeno total em profundidade ($p=0.027$, $r=0.633$), e o tipo III (birrefringência esverdeada) e tipo I (birrefringência amarelo-avermelhada) correlacionaram-se inversamente com superfície e profundidade ($p<0.001$, $r=-1.000$). Imunomarcção para TGF- β mostrou correlação direta com o colágeno total na superfície ($p=0.027$, $r=0.811$), e a imunomarcção na profundidade de FOP foi diretamente correlacionada com o colágeno tipo I na superfície ($p<0.001$, $r=1.000$) e inversamente correlacionada com o colágeno tipo III na superfície ($p<0.001$, $r=-1.000$) (Tabela 4).

Tabela 2. Efeitos do sexo, presença nos ossos gnáticos e localização nos achados histológicos dos casos de GP e FOP.

	Sexo						Presença nos ossos gnáticos						Localização					
	GP			FOP			GP			FOP			GP			FOP		
	Fem.	Masc.	p-Valor	Fem.	Masc.	p-Valor	Maxila	Mandíbula	p-Valor	Maxila	Mandíbula	p-Valor	Anterior	Posterior	p-Valor	Anterior	Posterior	p-Valor
Colágeno Total superficial	3.0±1.2	3.5±1.4	*0.813	7.4±2.2	3.8±0.9	*0.217	3.5±1.3	1.3±0.2	*0.375	6.5±2.3	5.2±1.9	*0.674	4.2±1.7	1.2±0.3		9.9±2.8	4.0±0.9	*0.165
Colágeno Total profundo	33.4±3.5	21.6±2.4	*0.056	11.5±4.0	2.8±1.4	*0.099	26.3±4.1	31.1±3.8	*0.573	7.0±3.2	8.1±4.4	*0.849	26.9±2.9	36.7±9.6	*0.124	10.8±7.0	5.6±3.0	*0.457
Colágeno Tipo I superficial	28.6±7.3	20.5±1.6	*0.297	100.0±0.0	100.0±0.0	*0.407	19.7±1.4	18.8±4.7	*0.811	100.0±0.0	100.0±0.0	*1.000	17.8±1.3	20.3±5.6	*0.388	100.0±0.0	100.0±0.0	*1.000
Colágeno Tipo I profundo	50.4±5.9	63.7±7.1	*0.162	92.2±7.7	100.0±0.0	*0.374	57.3±8.2	45.5±6.5	*0.444	90.3±9.6	100.0±0.0	*0.292	64.3±9.1	39.2±11.1	*0.521	100.0±0.0	92.2±7.7	*0.482
Colágeno Tipo III superficial	77.2±4.6	79.4±1.6	*0.671	0.0±0.0	0.0±0.0	*1.000	80.2±1.4	81.1±4.7	*0.812	0.0±0.0	0.0±0.0	*1.000	82.2±1.3	79.6±5.6	*0.139	0.0±0.0	0.0±0.0	*1.000
Colágeno Tipo III profundo	53.4±4.9	36.2±7.1	*0.056	7.7±7.7	0.0±0.0	*0.374	42.6±8.2	54.4±6.5	*0.445	9.6±9.6	0.0±0.0	*0.292	35.6±9.1	60.7±11.1	*0.521	0.0±0.0	7.7±7.7	*0.482
Células TGF-β+ superficial	37.7±6.5	48.2±3.4	*0.503	53.3±20.7	31.3±9.0	*0.386	35.2±6.8	42.1±8.2	*0.556	53.3±20.7	23.0±6.3	*0.347	40.0±6.4	35.2±12.1	*0.834	40.3±28.1	43.2±13.6	*0.919
Células TGF-β+ profundo	70.3±8.6	60.7±2.3	*0.238	68.1±9.3	67.7±15.8	*0.980	64.5±2.9	69.5±15.6	*0.692	66.0±21.3	66.4±8.4	*0.987	64.8±8.4	70.0±10.2	*0.744	57.6±34.0	70.6±6.7	*0.769

*Teste t; dados expressos em média ± EP.

Tabela 3. Efeitos da idade, Tempo de Evolução e Tamanho das lesões nos achados histológicos dos casos de GP e FOP.

		GP			FOP		
		Tempo			Tempo		
		Idade	de	Tamanho	Idade	de	Tamanho
		Evolução			Evolução		
Colágeno Total	r	0.170	-0.017	0.278	-0.576	-0.258	-0.263
Superficial	p-Valor	0.416	0.950	0.407	0.104	0.622	0.668
Colágeno Total	r	-0.130	-0.254	-0.595	-0.204	-0.227	-0.671
Profundo	p-Valor	0.536	0.325	0.054	0.599	0.666	0.215
Colágeno Tipo I	r	0.003	-0.145	0.475	0.000	0.000	0.000
Superficial	p-Valor	0.989	0.577	0.140	1.000	1.000	1.000
Colágeno Tipo I	r	0.195	0.422*	0.259	0.073	0.488	0.700
Profundo	p-Valor	0.350	0.042	0.441	0.852	0.326	0.188
Colágeno Tipo III	r	-0.188	0.202	-0.475	0.000	0.000	0.000
Superficial	p-Valor	0.390	0.454	0.140	1.000	1.000	1.000
Colágeno Tipo III	r	-0.271	-0.583*	-0.259	-0.073	-0.488	-0.700
Profundo	p-Valor	0.200	0.018	0.441	0.852	0.326	0.188
Células TGF-β +	r	-0.048	0.521	-0.173	-0.024	-0.716	0.972*
Superficial	p-Valor	0.881	0.150	0.656	0.964	0.174	0.028
Células TGF-β +	r	-0.085	-0.318	0.090	0.194	-0.887*	-0.142
Profundo	p-Valor	0.793	0.404	0.832	0.592	0.019	0.761

*p<0.05, Teste de correlação de Pearson.

Tabela 4. Correlação entre imunomarcção para TGF- β e perfil de colágeno nos casos de GP e FOP

		Colágeno Total Superficial	Colágeno Total Profundo	Colágeno Tipo I Superficial	Colágeno Tipo I Profundo	Colágeno Tipo III Superficial	Colágeno Tipo III Profundo	Células TGF- β + Superficial	Células TGF- β + Profundo
GP									
Colágeno Total	r	-	-0.325	-0.598*	-0.682*	0.598*	0.682*	0.173	-0.321
Superficial	p-Valor	-	0.091	0.001	<0.001	0.001	<0.001	0.554	0.264
Colágeno Total	r	-	-	-0.363	0.247	0.363	0.247	-0.397	0.403
Profundo	p-Valor	-	-	0.058	0.072	0.058	-0.072	0.160	0.153
Colágeno Tipo I	r	-	-	-	0.298	-1.000*	-0.298	0.227	0.208
Superficial	p-Valor	-	-	-	0.124	<0.001	0.124	0.435	0.476
Colágeno Tipo I	r	-	-	-	-	-0.298	-1.000*	0.062	-0.296
Profundo	p-Valor	-	-	-	-	0.124	<0.001	0.833	0.304
Colágeno Tipo III	r	-	-	-	-	-	0.298	-0.227	-0.208
Superficial	p-Valor	-	-	-	-	-	0.124	0.435	0.476
Colágeno Tipo III	r	-	-	-	-	-	-	-0.062	0.296
Profundo	p-Valor	-	-	-	-	-	-	0.833	0.304
Células TGF- β +	r	-	-	-	-	-	-	-	0.524
Superficial	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	0.066
Células TGF- β +	r	-	-	-	-	-	-	-	-
Profundo	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	-
FOP									
Colágeno Total	r	-	0.633*	-0.234	-0.142	0.234	0.142	0.126	-0.129
Superficial	p-Valor	-	0.027	0.464	0.661	0.464	0.661	0.788	0.808
Colágeno Total	r	-	-	-0.374	-0.467	0.374	0.467	0.811*	0.509
Profundo	p-Valor	-	-	0.231	0.126	0.231	0.126	0.027	0.303
Colágeno Tipo I	r	-	-	-	0.625*	-1.000*	-0.195	-0.451	1.000*
Superficial	p-Valor	-	-	-	0.022	<0.001	0.543	0.310	<0.001
Colágeno Tipo I	r	-	-	-	-	-0.195	-1.000*	-0.669	-0.344
Profundo	p-Valor	-	-	-	-	0.543	<0.001	0.100	0.504
Colágeno Tipo III	r	-	-	-	-	-	0.195	0.451	-1.000*
Superficial	p-Valor	-	-	-	-	-	0.543	0.310	<0.001
Colágeno Tipo III	r	-	-	-	-	-	-	0.669	0.344
Profundo	p-Valor	-	-	-	-	-	-	0.100	0.504
Células TGF- β +	r	-	-	-	-	-	-	-	0.799*
Superficial	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	0.031
Células TGF- β +	r	-	-	-	-	-	-	-	-
Profundo	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	-

*p<0.05, teste de correlação de Pearson.

4. DISCUSSÃO

GP e FOP são as duas lesões mais prevalentes no tecido gengival. Tem sido proposto que GP é causado por bactérias piogênicas e FOP tem uma origem neoplásica.¹ Atualmente é conhecido que GP e FOP são lesões reativas que estão fortemente associadas com biofilme dental.³⁻⁴

No presente estudo, levantamentos epidemiológicos não mostraram diferenças significativas entre GP e FOP com relação à distribuição por idade e predileção por mulheres.⁴⁻⁶ A distribuição topográfica varia de acordo com o estudo, demonstrando que há mais casos de GP em maxila e região anterior⁷ e mais casos de FOP em mandíbula e região posterior,²¹ como evidenciado em nosso estudo, embora o oposto também tenha sido descrito.⁶

Com relação ao tamanho e o tempo de evolução, enquanto Zhang e colaboradores⁴ mostraram um tempo de evolução mais longo do GP em relação ao FOP, nosso estudo não mostrou diferença significativa. Além disso, embora Effiom e colaboradores⁵ não mostrarem nenhuma diferença no tamanho das duas lesões, Kfir e colaboradores⁶ demonstraram que FOP era significativamente maior do que GP (similar a nosso estudo).

Em relação às características clínicas e microscópicas, GP exibe sangramento e é nodular, firme, eritematoso, ulcerado e densamente inflamado,⁷ enquanto FOP é uma lesão nodular e firme, com células fusiformes, alta celularidade, vascularização moderada e sem inflamação.²² Apesar dessas diferenças, apresentam um tecido conjuntivo abundante, porém, o FOP, demonstrando mineralização.²²⁻²³

O colágeno total e o tipo I (forma madura das fibras colágenas) aumentou gradualmente da superfície para a profundidade em GP. A superfície de GP é intensamente inflamada (inflamação aguda) e isso aumenta a expressão de metaloproteinases de matriz (MMP). MMPs degradam o colágeno, reduzindo a sua quantidade.²⁴⁻²⁵ Além disso, a profundidade de GP apresenta alta imunomarcagem para TGF- β , uma citocina que está fortemente associada com a produção e maturação de colágeno.¹⁵ No entanto, a profundidade de GP não mostra níveis de inflamação crônica elevados. Assim, isso pode explicar a superprodução e maturação do colágeno na profundidade de GP, que é comum em GPs antigos com suave inflamação.¹

No FOP, há baixos níveis de colágeno total, mas a proporção de colágeno tipo I é mais alta, bem como a expressão de TGF- β . O TGF- β estimula não somente a produção de colágeno, mas também a maturação do colágeno tipo III em colágeno tipo I,²⁶ e essa

capacidade tem sido demonstrada na modulação da produção de matriz óssea, particularmente na ausência de inflamação.²⁷ Estudos prévios sugerem que, em alguns tipos celulares (fibroblastos), o papel do TGF- β está mais fortemente associado à maturação óssea do colágeno do que a superprodução de colágeno.^{15,18,22} Se isso for verdade, então os fibroblastos de GP seriam diferentes dos fibroblastos de FOP?

Fibroblastos, células presentes tanto em GP como em FOP, produzem TGF- β ,¹⁵ entretanto, a origem dessas células parece ser diferente nessas lesões. Os fibroblastos do ligamento periodontal produzem níveis mais elevados de osteoprotegerina (OPG) do que os fibroblastos gengivais.²⁸ OPG é uma citocina que leva à maturação óssea, e, portanto, a origem desses fibroblastos pode ser diferente. Kumar e colaboradores¹¹ sugeriram que os fibroblastos de FOP são originados do ligamento periodontal, e, assim, os fibroblastos de GP podem ser originados da gengiva ou do tecido conjuntivo, justificando localizações extra gengivais de GP.¹

Recentemente, Elanagei e colaboradores²⁹ mostraram que, em contraste com o GP, as células na profundidade de FOP produzem osteopontina (OPN), uma proteína responsável pela deposição de matriz mineral em matriz orgânica⁹ na presença de TGF- β .³⁰ Assim, esses achados suportam nossa hipótese de que as células de FOP são de origem diferente das células de GP.

Em adição, nossos achados sugerem que o crescimento do FOP e sua maturação do colágeno dependem de TGF- β produzidos na superfície, mas durante longos períodos de tempo, há uma redução da sua produção na profundidade. Isso pode ser explicado pelo fato de haver uma redução da celularidade nos casos de FOP mais antigos. No geral, mostramos que, no FOP, a produção de colágeno é dependente de TGF- β , e a maturação do colágeno está diretamente relacionada à quantidade de colágeno. Em GP, nossos achados sugerem que a maturação do colágeno está diretamente associada ao tempo de evolução, apoiando a hipótese de maturação fibrosa de GP, como sugerido por Stablein e Silverglade.¹

Portanto, devido aos diferentes comportamentos de colagênese, propomos que GP e FOP tenham origem de fibroblastos distintos. Devido a ausência de inflamação e na presença de níveis elevados de TGF- β , há mineralização em FOP, mas não em GP. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar o papel das citocinas e proteínas ósseas no metabolismo dessas lesões.

REFERÊNCIAS

1. Stablein MJ, Silverglade LB. Comparative analysis of biopsy specimens from gingiva and alveolar mucosa. *J Periodontol* 1985;56:671–676.
2. Buchner A, Shnaiderman-Shapiro A, Vered M. Relative frequency of localized reactive hyperplastic lesions of the gingiva: a retrospective study of 1675 cases from Israel. *J Oral Pathol Med* 2010;39:631-638.
3. Kamath KP, Vidya M, Anand PS. Biopsied Lesions of the Gingiva in a Southern Indian Population – A Retrospective Study. *Oral Health Prev Dent* 2013;11:71-79.
4. Zhang W, Chen Y, An Z, Geng N, Bao D. Reactive gingival lesions: a retrospective study of 2,439 cases. *Quintessence Int* 2017;38:103-110.
5. Effiom OA, Adeyemo WL, Omitola OG, Ajayi OF, Emmanuel MM, Gbotolorun OM. Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathologic review of 233 cases in Lagos, Nigeria. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66:1595-1599.
6. Kfir Y, Buchner A, Hansen LS. Reactive lesions of the gingiva. A clinicopathological study of 741 cases. *J Periodontol* 1980;51:655-661.
7. Gordón-Núñez MA, de Vasconcelos Carvalho M, Benevenuto TG, Lopes MF, Silva LM, Galvão HC. Oral pyogenic granuloma: a retrospective analysis of 293 cases in a Brazilian population. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:2185-2188.
8. Saravana GH. Oral pyogenic granuloma: a review of 137 cases. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2009;47:318-319.
9. Mergoni G, Meleti M, Magnolo S, Giovannacci I, Corcione L, Vescovi P. Peripheral ossifying fibroma: A clinicopathologic study of 27 cases and review of the literature with emphasis on histomorphologic features. *J Indian Soc Periodontol* 2015;19:83-87.
10. Shivaswamy S, Siddiqui N, Jain SA, Koshy A, Tambwekar S, Shankar A. A rare case of generalized pyogenic granuloma: a case report. *Quintessence Int* 2011;42:493-499.
11. Kumar SK, Ram S, Jorgensen MG, Shuler CF, Sedghizadeh PP. Multicentric peripheral ossifying fibroma. *J Oral Sci* 2006;48:239-243.
12. Buchner A, Hansen LS. The histomorphologic spectrum of peripheral ossifying fibroma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987;63:452-461.
13. Bhaskar SN, Jacoway JR. Peripheral fibroma and peripheral fibroma with calcification: Report of 376 cases. *J Am Dent Assoc* 1966;73:1312-1320.
14. Lawoyin JO, Arotiba JT, Dosumu OO. Oral pyogenic granuloma: a review of 38 cases from Ibadan, Nigeria. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1997;35:185-189.

15. Morandini AC, Sipert CR, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Santos CF. Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of TGF- β , interleukin (IL)-8 and IL-10. *Braz Oral Res* 2011;25:157-162.
16. Jagadeesan J, Bayat A. Transforming growth factor beta (TGFbeta) and keloid disease. *Int J Surg* 2007;5:278-285.
17. Tsai S, Hollenbeck ST, Ryer EJ, et al. TGF-beta through Smad3 signaling stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H540-H549.
18. Einhorn TA, Marsell R. The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury* 2009;40:s4-s7.
19. Yamane K, Ihn H, Asano Y, Jinnin M, Tamaki K. Antagonistic effects of TNF-alpha on TGF-beta signaling through down-regulation of TGF-beta receptor type II in human dermal fibroblasts. *J Immunol* 2003;171:3855-3862.
20. Oliveira BV, Barros Silva PG, Nojosa JDE S, et al. TNF-alpha expression, evaluation of collagen, and TUNEL of *Matricaria recutita* L. extract and triamcinolone on oral ulcer in diabetic rats. *J Appl Oral Sci* 2016;24:278-290.
21. Carbone M, Broccoletti R, Gambino A, et al. Clinical and histological features of gingival lesions: a 17-year retrospective analysis in a northern Italian population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012;17:555-561.
22. Hunasgi S1, Raghunath V. A clinicopathological study of ossifying fibromas and comparison between central and peripheral ossifying fibromas. *J Contemp Dent Pract*. 2012;13:509-514.
23. Kamal R, Dahiya P, Puri A. Oral pyogenic granuloma: Various concepts of etiopathogenesis. *J Oral Maxillofac Pathol* 2012;16:79-82.
24. Siwik DA, Chang DL, Colucc WS. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res* 2000;86:1259-1265.
25. Agren MS, Schnabel R, Christensen LH, Mirastschijski U. Tumor necrosis factor- α -accelerated degradation of type I collagen in human skin is associated with elevated matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 ex vivo. *Eur J Cell Biol* 2015;94:12-21.
26. Reed MJ, Vernon RB, Abrass IB, Sage EH. TGF-beta 1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors. *J Cell Physiol* 1994;158:169-179.
27. Bonewald LF, Mundy GR. Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop Relat Res* 1990;250:261-276.

28. Belibasakis GN, Bostanci N, Hashim A, et al. Regulation of RANKL and OPG gene expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Porphyromonas gingivalis*: a putative role of the Arg-gingipains. *Microb Pathog* 2007;43:46-53.
29. Elanagai R, Veeravarmal V, Nirmal RM. Osteopontin expression in reactive lesions of gingiva. *J Appl Oral Sci* 2015;23:26-32.
30. Weber CE, Li NY, Wai PY, Kuo PC. Epithelial-Mesenchymal Transition, TGF- β , and Osteopontin in Wound Healing and Tissue Remodeling After Injury. *J Burn Care Res* 2012;33:311-318.
31. Brizeno LAC. Avaliação da cicatrização em modelo de úlcera em mucosa oral de ratos portadores de diabetes mellitus induzida por aloxano. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2013.