

Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Faculdade de Odontologia

IMUNOLOCALIZAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS

EM PROCESSOS PROLIFERATIVOS NÃO

NEOPLÁSICOS GENGIVAIS

LEONARDO SILVEIRA DAMASCENO

**Belo Horizonte
2008**

Leonardo Silveira Damasceno

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DE
MIOFIBROBLASTOS EM PROCESSOS
PROLIFERATIVOS NÃO NEOPLÁSICOS
GENGIVAIS**

**Dissertação apresentada à
Pontifícia Universidade Católica
de Minas Gerais como pré-
requisito para a obtenção do grau
de Mestre em Odontologia, área
de concentração Clínicas
Odontológicas, ênfase em
Periodontia**

**Orientador: Prof. Dr. Martinho
Campolina Rebello Horta**

**Belo Horizonte
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

D155i	<p>Damasceno, Leonardo Silveira Imunolocalização de miofibroblastos em processos proliferativos não neoplásicos gengivais / Leonardo Silveira Damasceno. - Belo Horizonte, 2008. 75 f. : il.</p> <p>Orientador: Martinho Campolina Rebello Horta Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação Odontologia. Bibliografia.</p> <p>1. Doenças gengivais . 2. Hiperplasia gengival. 3. Granuloma piogênico. 4. Fibroma ossificante. 5. Lesão periférica de células gigantes. I. Horta, Martinho Campolina Rebello. II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 616.311.2</p>
-------	--

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a três pessoas fundamentais em minha vida: ao meu pai Eden que através da sua perseverança ao longo da vida soube me guiar pelos caminhos certos e me deu oportunidade e apoio para seguir a diante nos estudos; a minha mãe Régia que é um símbolo de luta e amor para mim e meus irmãos; e para minha doce e amável filha Lis que, mesmo não sabendo, me deu forças para superar as dificuldades nestes últimos dois anos. Para vocês dedico o fruto daquilo que tanto sonhei. Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar devo agradecimento muito especial ao meu orientador Prof. Martinho. Docente de capacidade intelectual impar, de puro senso crítico, dedicado, camarada e de inúmeros predicados a mais. Hoje posso dizer que é um grande amigo. Sempre disposto a cooperar, deixou em mim a marca de uma pessoa fora do comum. Obrigado pelo seu esforço. Espero ter o imenso prazer de dividir outras pesquisas com você.

A todos os professores do curso de mestrado em clínicas odontológicas da PUC Minas, em especial aos professores Elton, Rodrigo e Adriana, que não mediram esforços para transmitir o máximo de conhecimento. Sem vocês eu não realizaria este sonho.

A todos os alunos da minha turma de mestrado, em especial a Eliene, Thaís e Giselle que dividiram intensamente comigo a labuta de se fazer um curso de mestrado e ao grande colega Frederico Marques que estava sempre no lugar certo, na hora exata para me ajudar.

Aos funcionários da PUC Minas, principalmente Reni, Silvania e Angélica.

Aos alunos de graduação em odontologia da PUC Minas Fernanda e Edson que se dedicaram ao extremo na parte técnica desta pesquisa.

Agradeço a minha querida avó Lygia, que todos os dias reza por mim, sempre preocupada com minha saúde. Agradeço ao meu avô Zé que de outro plano saboreia esta vitória.

Aos meus irmãos Ninha e Dé que souberam dividir comigo as dificuldades nestes anos de estudo. Muito obrigado pelo esforço de vocês e por tanto me auxiliarem.

Ao colega e grande amigo Eder que soube ouvir minhas lamentações sempre me dando bons conselhos e que compartilhou comigo todos os meus momentos de felicidades e tristezas.

A você minha linda BÍola que sabe há anos o quanto eu desejava realizar este curso e que pacientemente aguentou vários finais de semana longe de mim. Agora sou todo seu.

Ao Edilberto, símbolo de amizade eterna e ao Kirlian que nos manterá sempre próximos.

Agradeço a minhas companheiras de trabalho e amigas Inês, Juju e Virgínia que suportaram meus momentos de stress dando-me como apoio seus sorrisos. Sem vocês eu nada seria. Esta vitória também é de vocês.

Ao colega e amigo Fabiano. Nossa história na odontologia se confunde e mais uma vez seguimos o mesmo caminho. Muito obrigado.

A todos os meus pacientes que entenderam por várias vezes a minha ausência.

SUMÁRIO

LISTA DE ARTIGOS	7
RESUMO	8
INTRODUÇÃO GERAL	10
OBJETIVOS DO ESTUDO	18
CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
ABSTRACT	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES	23
ANEXO 1: CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	30
ANEXO 2: ARTIGO 1	31
ANEXO 3: ARTIGO 2	54
ANEXO 4: DADOS CLÍNICOS DAS AMOSTRAS UTILIZADAS	72

LISTA DE ARTIGOS

Esta dissertação gerou as seguintes propostas de artigos:

1. Processos proliferativos não neoplásicos gengivais – Revisão da literatura 31
(A ser submetido à Revista de Periodontia da SOBRAPE)
2. Myofibroblasts in focal reactive overgrowths of the gingiva 54
(A ser submetido à revista Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal)

RESUMO

A mucosa gengival pode desenvolver processos proliferativos não neoplásicos secundários ao processo inflamatório desencadeado pela ação de irritantes locais. Entre estes processos, destacam-se a hiperplasia fibrosa focal, o fibroma ossificante periférico, o granuloma piogênico e a lesão periférica de células gigantes. Miofibroblastos são fibroblastos diferenciados que possuem características intermediárias entre fibroblastos clássicos e células musculares lisas, por expressarem a proteína alfa actina de músculo liso ou α -SMA (alpha-smooth muscle actin). Representam uma das principais células responsáveis pela síntese e degradação de componentes da matriz extracelular durante os processos de inflamação, reparo e remodelação tecidual, participando ativamente de processos patológicos caracterizados pela fibrose de órgãos e tecidos. Embora a presença de miofibroblastos tenha sido relatada em fibromatose gengival hereditária e em hiperplasia gengival medicamentosa, poucos estudos avaliam o papel dos miofibroblastos no desenvolvimento de processos proliferativos não neoplásicos gengivais. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de miofibroblastos em hiperplasia fibrosa focal, fibroma ossificante periférico, granuloma piogênico e lesão periférica de células gigantes, investigando sua possível participação no desenvolvimento destes processos proliferativos não neoplásicos gengivais. Foram selecionadas 10 amostras de mucosa gengival normal, 10 amostras de hiperplasia fibrosa focal, 10 amostras de fibroma ossificante periférico, 10 amostras de granuloma piogênico, e 10 amostras de lesão periférica de células gigantes provenientes de material de arquivo embocado em parafina. Estas amostras foram submetidas à reação de imunistoquímica para o marcador de miofibroblastos

α -SMA. Imunomarcção para células de músculo liso de vasos sanguíneos foi utilizado como controle positivo. A ausência de miofibroblastos foi observada em todas as amostras de mucosa gengival normal, hiperplasia fibrosa focal, granuloma piogênico, fibroma ossificante periférico e lesão periférica de células gigantes. Os resultados sugerem que miofibroblastos não participam no desenvolvimento dos processos proliferativos não neoplásicos gengivais avaliados.

Palavras chave: Imunoistoquímica, Doenças gengivais, Hiperplasia Gengival; Granuloma Piogênico; Fibroma Ossificante; Lesão Periférica de Células Gigantes.

INTRODUÇÃO GERAL

Em periodontia, o clínico frequentemente depara-se com condições que envolvem processos inflamatórios relacionados ao biofilme dental, como gengivite e periodontite, que lideram os diagnósticos periodontais (LÖE *et al.*, 1978; GJERMO *et al.*, 2002). Entretanto, alguns pacientes podem apresentar outros processos patológicos localizados no periodonto, entre os quais se destacam processos proliferativos não neoplásicos que são lesões caracterizadas por proliferação celular secundária a um processo inflamatório desencadeado pela ação de irritantes locais sobre a mucosa bucal (SAPP *et al.*, 1997; NEVILLE *et al.*, 2004). Os processos proliferativos não neoplásicos gengivais mais comuns são hiperplasia fibrosa focal (fibroma traumático) granuloma piogênico, fibroma ossificante periférico e lesão periférica de células gigantes (BUCHNER *et al.*, 1977; SAPP *et al.*, 1997; NEVILLE *et al.*, 2004).

A hiperplasia fibrosa focal representa uma reação hiperplásica a agentes irritantes locais (trauma, biofilme dental, cálculo, restaurações com margens irregulares) que desencadeiam um processo inflamatório caracterizado pela proliferação de fibroblastos e pela intensa deposição de fibras colágenas (KFIR *et al.*, 1980; SAPP *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2007). Quando acomete a gengiva, sua localização é mais comum na região anterior da maxila, usualmente na papila interdental (BUCHNER *et al.*, 1977; KFIR *et al.*, 1980). Manifesta-se como um nódulo, sésil ou pediculado, de consistência firme, cor frequentemente similar a da mucosa normal adjacente, geralmente assintomático e com diâmetro menor que 2 centímetros (BUCHNER *et al.*, 1977; KFIR *et al.*, 1980). Histologicamente, a lesão caracteriza-se pela proliferação de fibroblastos associados à deposição de feixes de fibras

colágenas dispostos em várias direções, além da presença de infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (KFIR *et al.*, 1980; ZHANG *et al.*, 2007). A lesão é coberta por epitélio estratificado pavimentoso e pode mostrar-se ulcerada em áreas traumatizadas (KFIR *et al.*, 1980).

O fibroma ossificante periférico também denominado de fibroma cemento ossificante periférico é um processo proliferativo caracterizado pela proliferação de tecido conjuntivo fibroso associado à deposição de osso e de material mineralizado semelhante a cimento (BUCHNER e HANSEN, 1987; SAPP *et al.*, 1997). De patogênese incerta, acredita-se que estas lesões estejam associadas à proliferação reacional de células do tecido conjuntivo gengival, periósteo ou do ligamento periodontal com potencial osteogênico (BUCHNER e HANSEN, 1987; YANG *et al.*, 1993; SAPP *et al.*, 1997). Representa também uma lesão reacional a irritantes locais, principalmente biofilme dental (SAPP *et al.*, 1997; NEVILLE *et al.*, 2004). O fibroma ossificante periférico acomete exclusivamente a gengiva e o rebordo alveolar (BUCHNER e HANSEN, 1987; FORTES *et al.*, 2002). Caracteriza-se pela presença de um nódulo, de base pediculada ou séssil, podendo ocorrer na forma lobulada (BUCHNER e HANSEN, 1987; KFIR *et al.*, 1980; FORTES *et al.*, 2002). Histologicamente, a lesão apresenta numerosos fibroblastos fusiformes ou ovóides, com núcleos frequentemente volumosos e vesiculares. Estas células podem ser permeadas por quantidade variável de fibras colágenas, trabéculas de osteóide, trabéculas de osso maduro, áreas de calcificação distrófica e corpos mineralizados ovóides semelhantes a cimento. Infiltrado inflamatório composto predominantemente de linfócitos e plasmócitos pode também ser observado (BUCHNER e HANSEN, 1987).

O granuloma piogênico é um processo proliferativo não neoplásico de pele e mucosas caracterizado pela proliferação reacional de células endoteliais, sendo a mucosa bucal um dos sítios mais afetados (ANGELOPOULOS, 1971; SAPP *et al.*, 1997). Representa uma resposta tecidual exacerbada a um irritante não específico local (biofilme dental, cálculo ou margem de restaurações em excesso) ou injúria traumática que desencadeiam um processo inflamatório (BHASKAR e JACOWAY, 1966; KFIR *et al.*, 1980; JAFARZADEH *et al.*, 2006). O granuloma piogênico é o processo proliferativo não neoplásico mais frequentemente encontrado na gengiva (BHASKAR e LEVIN, 1973; BUCHNER *et al.*, 1977; FORTES *et al.*, 2002; AL-KHATEEB e ABABNEL, 2003; ZAREI *et al.*, 2006; SHAMIM *et al.*, 2008). Seu aspecto clínico é de um nódulo, pediculado ou séssil, com uma superfície lisa, lobulada ou papilar, comumente ulcerada e que tende ao sangramento espontâneo ou sobre leve trauma (ANGELOPOULOS, 1971; KFIR *et al.*, 1980). Histologicamente, caracteriza-se pela presença de proliferação endotelial associada à formação de espaços vasculares. Proliferação de células endoteliais e de vasos sanguíneos organizados em lóbulos pode também ser observada. Células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares estão presentes na lâmina própria. O granuloma piogênico é recoberto por epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado ou paraqueratinizado que frequentemente encontra-se ulcerado (BHASKAR e JACOWAY, 1966; BHASKAR e LEVIN, 1973; KFIR *et al.*, 1980; SAPP *et al.*, 1997; NEVILLE *et al.*, 2004).

A lesão periférica de células gigantes é um processo proliferativo caracterizado pela presença de células mononucleares associadas a células gigantes multinucleadas, sendo uma lesão reativa originária do periósteo ou do ligamento periodontal, usualmente como resultado de fatores irritantes locais como biofilme dental, cálculo, trauma local e extração dentária (GIANSANTI e WALDRON, 1969; BHASKAR *et al.*, 1971; BODNER *et al.*, 1997; SAPP *et al.*, 1997; MOTAMEDI *et al.*, 2007). A lesão periférica de células gigantes é um processo proliferativo que ocorre exclusivamente na gengiva e em rebordos edêntulos (GIANSANTI e WALDRON, 1969; BHASKAR *et al.*, 1971; KFIR *et al.*, 1980; KATSIKERIS *et al.*, 1988; MOTAMEDI *et al.*, 2007). O aspecto clínico da lesão é de um nódulo, pediculado ou sésil, de consistência firme, com coloração que vai do vermelho ao arroxeadado (BHASKAR *et al.*, 1971; KFIR *et al.*, 1980; KATSIKERIS *et al.*, 1988). Com relação ao aspecto histológico, a lesão periférica de células gigantes apresenta, na lâmina própria, coleção bem delimitada de numerosas células mononucleares permeadas por células gigantes multinucleadas (GIANSANTI e WALDRON, 1969; BHASKAR *et al.*, 1971; BHASKAR e LEVIN, 1973; BUCHNER *et al.*, 1977; KFIR *et al.*, 1980; KATSIKERIS *et al.*, 1988; ZHANG *et al.*, 2007). As células mononucleares podem ser ovais ou fusiformes e apresentam núcleo arredondado e vesicular com nucléolo proeminente (KATSIKERIS *et al.*, 1988). As células gigantes multinucleadas podem exibir citoplasma eosinofílico e núcleos picnóticos, bem como citoplasma levemente basofílico com núcleos volumosos, ovóides, vesiculares e nucléolos proeminentes (BHASKAR *et al.*, 1971; KATSIKERIS *et al.*, 1988). Áreas hemorrágicas com deposição de hemossiderina também podem ser vistas na maioria dos casos (GIANSANTI e WALDRON, 1969;

BHASKAR *et al.*, 1971; KFIR *et al.*, 1980; KATSIKERIS *et al.*, 1988). Infiltrado inflamatório de linfócitos, plasmócitos e, ocasionalmente, histiócitos está presente na maior parte dos casos, com intensidade que geralmente varia de leve a moderado (KATSIKERIS *et al.*, 1988). Leucócitos polimorfonucleares também podem ser observados, geralmente associados a áreas de ulceração (KATSIKERIS *et al.*, 1988). Osso maduro ou osteóide pode ser visualizado em aproximadamente metade das lesões (KATSIKERIS *et al.*, 1988). Bonetti *et al.* (1990) demonstraram que as células gigantes multinucleadas exibiram imunomarcação para marcadores de osteoclastos, concluindo que sua origem poderia estar relacionada a células precursoras de osteoclastos indiferenciadas. Tiffée e Aufdemorte (1997), confirmaram que a maioria das células gigantes multinucleadas (99,26%) possuía imunomarcação para osteoclastos e que 38% também exibiam marcação específica para macrófagos. Segundo os autores, a lesão parece se originar de uma linhagem de macrófagos/histiócitos com aspectos intermediários entre osteoclastos e macrófagos.

Miofibroblastos são uma subpopulação de fibroblastos que desenvolvem morfológica e imunofenotipicamente características semelhantes à de células musculares lisas (POWELL *et al.*, 1999; TOMASEK *et al.*, 2002). A principal característica fenotípica do miofibroblasto está na capacidade de sintetizar proteínas citoesqueléticas sob a isoforma de α -SMA (SKALLI *et al.*, 1986; DESMOULIERE *et al.*, 2005) e filamentos protéicos que participam ativamente na contração celular de células musculares lisas (TOMASEK *et al.*, 2002). Ao microscópio óptico, os miofibroblastos apresentam-se com aspecto fusiforme ou estrelado e citoplasma palidamente eosinofílico (EYDEN, 2008).

Ultraestruturalmente, apresentam proeminente retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi produzindo grânulos de secreção, miofilamentos periféricos, junções em fibronexos e junções tipo Gap (EYDEN, 2008). Sintetizam feixes de microfilamentos em seu citoplasma, cujo conjunto é denominado fibras de “stress” (TOMASEK *et al.*, 2002). Estes estão dispostos paralelamente ao longo eixo axial da célula logo abaixo da membrana plasmática e a incorporação da α -SMA confere a estas células uma alta atividade contrátil (EYDEN, 2008).

A origem de miofibroblastos tem sido relacionada a fibroblastos presentes nas adjacências de sítios inflamados (GABBIANI *et al.*, 1971; MAJNO *et al.*, 1971). A diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos depende do meio extracelular (HINZ *et al.*, 2001) e da presença de fator de crescimento transformante beta-1 ou TGF- β_1 (transforming growth factor-beta 1) para a indução de síntese de α -SMA (DESMOULIERE *et al.*, 1993).

Miofibroblastos têm a habilidade de sintetizar e secretar citocinas, fatores de crescimento, mediadores inflamatórios, proteínas de adesão e componentes da matriz extracelular, principalmente colágeno tipo I, III, IV e VI (POWELL *et al.*, 1999). Adicionalmente, secretam metaloproteinases de matriz ou MMPs (matrix metalloproteinases) e inibidores teciduais de metaloproteinases ou TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases) (POWELL *et al.*, 1999; McKAIG *et al.*, 2003).

Miofibroblastos participam de processos fundamentais para o desenvolvimento como a morfogênese de tecidos e órgãos (POWELL *et al.*, 1999). Além disso, representam um caminho chave no reparo por cicatrização, participando ativamente na contração do tecido de granulação e fechamento da ferida (GABBIANI *et al.*, 1971; TOMASEK *et al.*, 2002; DESMOURIERE *et*

al.,2003; HINZ, 2007). Desempenham também papel importante no processo de invasão e metástase tumoral (DE WEVER *et al.*, 2004; KALLURI e ZEISBERG, 2006). Tendo em vista sua participação ativa na remodelação da matriz extracelular, os miofibroblastos participam de condições patológicas como a fibrose de órgãos e tecidos (DESMOURIERE *et al.*,2003; TOMASEK *et al.*, 2002; HINZ, 2007). Este processo está intimamente relacionado à sobrevivência de miofibroblastos nos sítios afetados (DESMOURIERE *et al.*,1995; TOMASEK *et al.*, 2002; HINZ, 2007). Após desempenhar sua função no reparo tecidual, estas células desaparecem por apoptose (DESMOURIERE *et al.*,1995; TOMASEK *et al.*, 2002). Contudo, a presença contínua de TGF- β_1 pode inibir a apoptose de miofibroblastos (ZHANG e PHAN, 1999), principalmente nos tecidos nos quais o processo inflamatório se perpetua (FUJITA *et al.*, 2002; TOMASEK *et al.*, 2002; DESMOURIERE *et al.*, 2003; HINZ, 2007).

Em um estudo com amostras de tecidos gengivais oriundos de hiperplasia gengival induzida por fenitoína, Dill e Iacopino (1997), identificaram, através de microscopia eletrônica, células com características de miofibroblastos.

Dayan *et al.* (1989) demonstraram a presença de miofibroblastos em 5 amostras de lesão periférica de células gigantes utilizando histoquímica para miosina como marcador de miofibroblastos. A observação em microscopia óptica demonstrou presença de ocasionais miofibroblastos próximos às células gigantes multinucleadas. Estas células também foram identificadas ultraestruturalmente através de características como núcleo alongado e um complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido.

Lombardi e Morgan (1995) demonstraram, através de imunomarcção para α -SMA, que lesões fibrosas da mucosa bucal como fibroma ossificante periférico e hiperplasia fibrosa foram essencialmente negativas para miofibroblastos.

Miguel *et al.* (2003) investigaram a presença de miofibroblastos em dez amostras de fibroma de células gigantes, dez de hiperplasia fibrosa e dez de fibroma de mucosa bucal, através de imunomarcção para HHF-35 (actina músculo-específica). A presença de miofibroblastos foi verificada apenas em dois casos de fibroma de células gigantes e em um de fibroma de mucosa bucal. Estes autores sugeriram que miofibroblastos não possuem uma participação significativa na patogênese destas lesões.

Bitu *et al.* (2006) observaram a presença de miofibroblastos em amostras de fibromatose gengival hereditária através de imunomarcção para α -SMA. Estas amostras também apresentaram aumento na expressão de TGF- β_1 , quando comparadas a tecido gengival normal. Os autores sugeriram que os miofibroblastos podem favorecer a fibrose gengival característica desta doença.

OBJETIVOS DO ESTUDO

Avaliar a presença de miofibroblastos nos seguintes processos proliferativos não neoplásicos gengivais: hiperplasia fibrosa focal, fibroma ossificante periférico, granuloma piogênico e lesão periférica de células gigantes.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Processos proliferativos não neoplásicos são lesões comuns na mucosa bucal e a gengiva é um sítio onde frequentemente estes processos ocorrem (STABLEIN & SILVERGLADE, 1985; SAPP *et al.*, 1997; NEVILLE *et al.*, 2004). Estas lesões são caracterizadas por proliferação celular secundária a um processo inflamatório desencadeado pela ação de irritantes locais sobre a mucosa bucal (BHASKAR & JACOWAY, 1966; GIANSANTI & WALDRON, 1969; BHASKAR *et al.*, 1971; KFIR *et al.*, 1980; BODNER *et al.*, 1997; SAPP *et al.*, 1997; JAFARZADEH *et al.*, 2006; MOTAMEDI *et al.*, 2007). Os processos proliferativos não neoplásicos gengivais mais comuns são a hiperplasia fibrosa focal, o fibroma ossificante periférico, o granuloma piogênico e a lesão periférica de células gigantes (BUCHNER *et al.*, 1977; SAPP *et al.*, 1997; NEVILLE *et al.*, 2004). Estas lesões são compostas por um ou mais componentes do tecido conjuntivo como colágeno, tecido mineralizado, células endoteliais e células gigantes multinucleadas (SAPP *et al.*, 1997). Hiperplasia fibrosa focal é caracterizada pela proliferação de fibroblastos e pela intensa deposição de fibras colágenas (KFIR *et al.*, 1980; SAPP *et al.*, 1997). O fibroma ossificante periférico caracteriza-se pela proliferação de tecido conjuntivo fibroso associado à deposição de osso e de material mineralizado semelhante a cimento (BUCHNER e HANSEN, 1987; SAPP *et al.*, 1997). O granuloma piogênico exibe intensa proliferação de células endoteliais (ANGELOPOULOS, 1971; SAPP *et al.*, 1997). A lesão periférica de células gigantes apresenta numerosas células mononucleares associadas a células gigantes multinucleadas (GIANSANTI e WALDRON, 1969; BHASKAR *et al.*, 1971; BODNER *et al.* 1997; SAPP *et al.*, 1997; MOTAMEDI *et al.*, 2007).

Miofibroblastos são fibroblastos diferenciados que possuem características intermediárias entre fibroblastos clássicos e células musculares lisas (GABBIANI *et al.*, 1971; SKALLI *et al.*, 1986; TOMASEK *et al.*, 2002). Representam uma das principais células responsáveis pela síntese e degradação de componentes da matriz extracelular durante os processos de inflamação, reparo e remodelação tecidual. Portanto, participam ativamente de processos patológicos caracterizados pela fibrose de órgãos e tecidos. (TOMASEK *et al.*, 2002; DESMOURIERE *et al.*, 2003; HINZ, 2007).

Embora a presença de miofibroblastos tenha sido relatada em fibromatose gengival hereditária (BITU *et al.*, 2006) e em hiperplasia gengival medicamentosa (DILL e IACOPINO, 1997), poucos estudos avaliam o papel dos miofibroblastos no desenvolvimento de processos proliferativos não neoplásicos gengivais.

Este estudo foi conduzido com 10 amostras de cada uma destas lesões para investigar a possibilidade de miofibroblastos estarem envolvidos em sua patogênese através de deposição contínua de constituintes da matriz extracelular.

Para a detecção de miofibroblastos, as amostras foram submetidas à reação imunoistoquímica para a detecção de α -SMA, um marcador de miofibroblastos amplamente utilizado na literatura (SKALLI *et al.*, 1986; TOMASEK *et al.*, 2002; HINZ, 2007).

ABSTRACT

Focal reactive overgrowths of the gingiva are lesions characterized by cell proliferation due to inflammatory process triggered by local irritants. The most common are focal fibrous hyperplasia (FFH), peripheral ossifying fibroma (POF), pyogenic granuloma (PG), and peripheral giant cell granuloma (PGCG). Myofibroblasts are differentiated fibroblasts that express alpha smooth muscle actin (α -sma). These cells synthesize and degrade extracellular matrix components during inflammation and process of tissue repair and remodeling. Consequently, myofibroblasts actively participate in diseases characterized by fibrosis of organs and tissues. Although the presence of myofibroblasts has been reported in hereditary gingival fibromatosis and drug-induced gingival hyperplasia, few studies evaluated its presence in focal reactive overgrowths of the gingiva. Therefore, the aim of this study is to evaluate the presence of myofibroblasts in the main focal reactive overgrowths of the gingiva (FFH, POF, PG, and PGCG). A total of 10 focal fibrous hyperplasia, 10 peripheral ossifying fibroma, 10 pyogenic granuloma, and 10 peripheral giant cell granuloma from archival formalin-fixed, paraffin-embedded specimens were evaluated. 10 samples of normal gingival mucosa were used as a control. Myofibroblasts were identified by immunohistochemical detection of α -sma, a marker for myofibroblasts. Normal vessel's smooth muscle immunoreactivity was used as a positive control. A light microscopy was used to evaluate the immunostaining results. No myofibroblasts were observed in normal gingival mucosa. FFH, PG, POF, and PGCG did not also show the presence of myofibroblasts. In conclusion, myofibroblasts were not detected in the focal reactive overgrowths

of the gingiva evaluated, suggesting that these cells do not participate in its pathogenesis.

Key words: myofibroblast, focal fibrous hyperplasia, pyogenic granuloma, peripheral ossifying fibroma, peripheral giant cell granuloma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES

- 1.AL-KHATEEB, T.; ABABNEB, K. Oral pyogenic granuloma in Jordanians: a retrospective analysis of 108 cases. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v.61, p.1285-1288, 2003.
- 2.ANGELOPOULOS, A.P. Pyogenic granuloma of the oral cavity: statistical analysis of its clinical features. **Journal of Oral Surgery**, Chicago, p.29, p.840-847, 1971.
- 3.BHASKAR, S.N.; CUTRIGHT, D.E.; BEASLEY, J.D.; PEREZ, B. Giant cell reparative granuloma (peripheral): report of 50 cases. **Journal of Oral Surgery**, Chicago, v.29, p.110-115, 1971.
- 4.BHASKAR, S.N.; JACOWAY, J.R. Pyogenic granuloma – clinical features, incidence, histology, and result of treatment: report of 242 cases. **Journal of Oral Surgery**, Chicago, v.24, p.391-398, 1966.
- 5.BHASKAR, S.N.; LEVIN, M.P. Histopathology of the human gingiva (study base on 1269 biopsies). **Journal of Periodontology**, Chicago, v.44, p.3-17, 1973.
- 6.BITU, C.C.; SOBRAL, L.M.; KELLERMANN, M.G.; MARTELLI-JUNIOR, H., ZECCHIN, K.G.; GRANER, E.; COLETTA, R.D. Heterogeneous presence of myofibroblasts in hereditary gingival fibromatosis. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v.33, n.6, p.393-400, Jun. 2006.
- 7.BODNER, L.; PEIST, M.; GATOT, A.; FLISS, D.M. Growth potential of peripheral giant cell granuloma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, St. Louis, v.83, p.548-551, 1997.
- 8.BONETTI, F.; PELOSI, G.; MARTIGNONI, G.; MOMBELLO, A.; ZAMBONI, G.; PEA, M.; SCARPA, A.; CHILOSI, M. Peripheral giant cell granuloma:

evidence for osteoclastic differentiation. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, St. Louis, v.70, p.471-475, 1990.

9.BUCHNER, A.; CALDERON, S.; RAMON, Y. Localized hyperplastic lesions of the gingiva: a clinicalpathological study of 302 lesions. **Journal of Periodontology**, Chicago, v.48, p.101-104, 1977.

10.BUCHNER, A.; HANSEN, L. The histomorphologic spectrum of peripheral ossifying fibroma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, St. Louis, v.63, p.452-461, 1987.

11.DAYAN, D.; BUCHNER, A.; David, R. Myofibroblasts in peripheral giant cell granuloma. Light and electron microscopic study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v.18, n.5, p.258-261, Oct. 1989.

12.DE WEVER, O.; NGUYEN, Q.D.; VAN HOORDE, L.; BRACKE, M.; BRUYNEEL, E.; GESPACH, C.; MAREEL, M. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.18, n.9, p.1016-1018, Epub 2004 Apr 1, Jun. 2004.

13.DESMOULIÈRE, A.; CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. **Wound Repair and Regeneration**, St. Louis, v.13, p.7-12, 2005.

14.DESMOULIÈRE, A.; DARBY, I.A.; GABBIANI, G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis **Laboratory Investigation**, New York, v.83, n.12, p.1689-1707, Dec. 2003.

15.DESMOULIÈRE, A.; GEINOZ, A.; GABBIANI, F.; GABBIANI, G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin

expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.122, n.1, p.103-111, Jul. 1993.

16.DESMOULIÈRE, A.; REDARD, M.; DARBY, I.A.; GABBIANI, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. **American Journal of Pathology**, Bethesda, v.146, n.1, p.56-66, Jan. 1995.

17.DILL, R.E.; IACOPINO, A.M. Myofibroblasts in phenytoin-induced hyperplastic connective tissue in the rat and in human gingival overgrowth. **Journal of Periodontology**, Chicago, v.68, n.4, p.375-380, Apr. 1997.

18.EYDEN, B. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Bucharest, v.12, p.22-37, 2008.

19.FORTES, T.M.V.; QUEIROZ, L.M.G.; PIVA, M.R.; SILVEIRA, E.J.D. Estudo epidemiológico de lesões proliferativas não neoplásicas da mucosa oral – análise de 20 anos. **Ciência Odontológica Brasileira**, São José dos Campos, v.5, n.3, p.54-61, 2002.

20.FUJITA, J.; OHTSUKI, Y.; SUEMITSU, I.; YAMADORI, I.; SHIGETO, E.; SHIODE, M.; NISHIMURA, K.; HIRAYAMA, T.; MATSUSHIMA, T.; ISHIDA, T. Immunohistochemical distribution of epithelioid cell, myofibroblast, and transforming growth factor-beta1 in the granuloma caused by Mycobacterium avium intracellulare complex pulmonary infection. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.46, n.2, p.67-74, 2002.

- 21.GABBIANI, G.; RYAN, G.B.; MAJNO, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. **Experientia**, Basel, v.27, n.5, p.549-550, May. 1971.
- 22.GIANSANTI, J.S.; WALDRON, C.A. Peripheral giant cell granuloma: review of 720 cases. **Journal of Oral Surgery**, Chicago, v.27, p.787-791, 1969.
- 23.GJERMO, P.; RÖSING, C.K.; SUSIN, C.; OPPERMAN, R. Periodontal diseases in Central and South America. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v.29, p.70-78, 2002.
- 24.HINZ, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. **The Journal of Investigative Dermatology**. Baltimore, v.127, n.3, p.526-537, Mar. 2007.
- 25.HINZ, B.; MASTRANGELO, D.; ISELIN, C.E.; CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v.159, n.3, p.1009-1020, Sep. 2001.
- 26.JAFARZADEH, H.; SANATKHANI, M.; MOHTASHAM, N. Oral pyogenic granuloma: a review. **Journal of Oral Science**, Tokyo, v.48, p.167-175, 2006.
- 27.KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblast in cancer. **Nature**, London, v.6, p.392-401, 2006.
- 28.KATSIKERIS, N.; KAKARANTZA-ANGELOPOULOU, E.; ANGELOPOULOS, A.P. Peripheral giant cell granuloma. Clinicopathologic study of 224 new cases and review of 956 reported cases. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v.17, p.94-99, 1988.

29.KFIR, Y.; BUCHNER, A.; HANSEN, L.S. Reactive lesions of the gingival: a clinicalpathological study of 741 cases. **Journal of Periodontology**, Chicago, v.51, n.11, p.655-661, 1980.

30.LÖE, H. ÅNERUD, Å.; BOYSEN, H.; MOORRISON, E. Natural history of periodontal disease in man: Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v.13, p.431-440, 1986.

31.LOMBARDI, T.; MORGAN, P.R. Immunohistochemical characterization of odontogenic cysts with mesenchymal and myofilament markes. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v.24, n.4, p.170-176, Apr. 1995.

32.MAJNO, G.; GABBIANI, G.; HIRSCHHEL, B.J.; RYAN, G.B.; STATKOV, P.R. Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. **Science**, New York, v.173, n.996, p.548-550, Aug. 1971.

33.MCKAIG, B.C.; MCWILLIAMS, D.; WATSON, S.A.; MAHIDA, Y.R. Expression and regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease. **The American Journal of Pathology**. Bethesda, v.162, n.4, p.1355-1360, Apr. 2003.

34.MIGUEL, M.C.da C.; ANDRADE, E.S.de S.; ROCHA, D.A.P.; FREITAS, R.de A.; SOUZA, L.B.de. Expressão imuno-histoquímica da vimentina e do HHF-35 em fibroma de células gigantes, hiperplasia fibrosa e fibroma da mucosa oral. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v.11, n.1, p.77-82, 2003.

35.MOTAMEDI, M.H.K.; ESHGHYAR, N.; JAFARI, S.M.; LASSEMI, E.; NAVI, F.; ABBAS, F.M.; KHALIFEH, S.; ESHKEVARI, P.S. Peripheral and central

giant cell granulomas of the jaws: a demographic study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, St. Louis, v.103, p.39-43, 2007.

36.NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. Tumores dos tecidos moles. In: NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.419-476.

37.POWELL, D.W.; MIFFLIN, R.C.; VALENTICH, J.D.; CROWE, S.E.; SAADA, J.I.; WEST, A.B. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v.277, p.c1-c9, 1999.

38.SAPP, J.P.; EVERSOLE, L.R.; WYSOCK, G.P.; Connective tissue lesions. In: SAPP, J.P.; EVERSOLE, L.R.; WYSOCK, G.P. **Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology**. 3^a ed. St. Louis: Mosby, 1997. p.277-318.

39.SHAMIM, T.; VARGHESE, V.I.; SHAMEENA, P.M.; SUDHA, S. A retrospective analysis of gingival biopsied lesions in south indian population: 2001-2006. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, Valencia, v.13, n.7, p.414-418, 2008.

40.SKALLI, O.; ROPRAZ, P.; TRZECIAK, A.; BENZONANA, G.; GILLESSEN, D.; GABBIANI, G. A monoclonal antibody against α -smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle cells differentiation. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.103, p.2787-2796, 1986.

41.STABLEIN, M.J.; SILVERGLADE, L.B. Comparative analysis of biopsy specimens from gingival and alveolar mucosa. **Journal of Periodontology**, Chicago, v.56, n.11, p.671-676, 1985.

42. TIFEEE, J.C.; AUFDEMORTE, T.B. Markers for macrophage and osteoclast lineages in giant cell lesions of the oral cavity. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v.55, p.1108-1112, 1997.
43. TOMASEK, J.J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R.A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v.3, p.349-363, 2002.
44. YANG, L-J.; JIN, Y.; DOI, T.; SEKINE, I.; OGAWA, K.; MORI, M. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic protein (BMP) in calcifying fibrous epulis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Copenhagen, v.22, p.406-410, 1993.
45. ZAREI, M.R.; CHAMANI, G.; AMANPOOR, S. Reactive hyperplasia of the oral cavity in Kerman province, Iran: a review of 172 cases. **British Association of Oral & Maxillofacial Surgeons**, Edinburgh, v.45, n.4, p.288-292, 2007.
46. ZHANG, H.Y.; PHAN, S.H. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1). **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, New York, v.21, n.6, p.658-665, Dec. 1999.
47. ZHANG, W.; CHEN, Y.; AN, Z.; GENG, N.; BAO, D. Reactive gingival lesions: a retrospective study of 2439 cases. **Quintessence International**, Berlin, v.38, n.2, p.103-110, 2007.

ANEXO 1: Carta de aprovação do comitê de ética

Belo Horizonte, 28 de setembro de 2007.

De: Profa. Maria Beatriz Rios Ricci
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Para: Martinho Campolina Rebello Horta
Faculdade de Odontologia PUC Minas

Prezado(a) pesquisador(a),

O Projeto de Pesquisa CAAE - 0161.0.213.000-07 “*Imunolocalização de miofibroblastos em processos proliferativos não neoplásicos gengivais*” foi **aprovado** no Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Minas.

Atenciosamente,

Profa. Maria Beatriz Rios Ricci
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – PUC Minas

ANEXO 2: Artigo de revisão da literatura que será submetido ao periódico
Revista de Periodontia da Sociedade Brasileira de Periodontologia

**Processos proliferativos não neoplásicos gengivais – Revisão da
literatura**

Focal reactive overgrowths of the gingiva – A review of the literature

Leonardo Silveira Damasceno¹, Fernanda da Silva Gonçalves², Edson Costa e Silva², Élton Gonçalves Zenóbio³, Paulo Eduardo Alencar de Souza⁴, Martinho Campolina Rebello Horta⁴

¹ Aluno do Curso de Mestrado em Clínicas Odontológicas, ênfase em Periodontia, da Faculdade de Odontologia da PUC Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

² Aluno do Curso de Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia da PUC Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

³ Professor Doutor da área de Periodontia, Faculdade de Odontologia da PUC Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

⁴ Professor Doutor das áreas de Estomatologia e Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia da PUC Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Autor correspondente:

Martinho Campolina Rebello Horta

Rua Ceará, 1338, 1101

Funcionários, Belo Horizonte, MG, Brasil

CEP 30150-311

Tel: (31) 33194341

e-mail: martinhhorta@pucminas.br

RESUMO

A mucosa gengival pode desenvolver processos proliferativos não neoplásicos secundários ao processo inflamatório desencadeado pela ação de irritantes locais. Entre esses processos, destacam-se a hiperplasia fibrosa focal, granuloma piogênico, fibroma ossificante periférico e lesão periférica de células gigantes. O objetivo desta revisão é abordar a etiopatogenia, as características clínicas, as características histopatológicas, o tratamento e o prognóstico destas lesões, enfatizando a importância do conhecimento destes processos patológicos para a prática clínica odontológica.

Palavras-chave: Doenças Gengivais; Epúlides; Hiperplasia Gengival; Granuloma Piogênico; Fibroma Ossificante; Lesão Periférica de Células Gigantes.

ABSTRACT

Focal reactive overgrowths of the gingiva are lesions characterized by cell proliferation due to inflammatory process triggered by local irritants. The most common are focal fibrous hyperplasia, peripheral ossifying fibroma, pyogenic granuloma, and peripheral giant cell granuloma. The aim of the present study is to review the etiopathogenesis, the clinical features, the histopathology, the treatment and the prognosis of these lesions, emphasizing its importance in dental clinical practice.

Key words: Gingival Disease; Epulis; Gingival Hyperplasia; Pyogenic Granuloma; Ossifying Fibroma; Giant Cell Granuloma.

INTRODUÇÃO

Em periodontia, frequentemente o clínico depara-se com condições que envolvem processos inflamatórios relacionados ao biofilme dental, como gengivite e periodontite, que lideram os diagnósticos periodontais (LÖE *et al.*, 1978; GJERMO *et al.*, 2002).

Entretanto, alguns pacientes podem apresentar outros processos patológicos localizados no periodonto, entre os quais se destacam processos proliferativos não neoplásicos, neoplasias, doenças mucocutâneas e manifestações bucais de doenças sistêmicas (STABLEIN e SILVERGLADE, 1985; SAPP *et al.*, 1997; NEVILLE *et al.*, 2004). Nestas situações, o clínico deve ser capaz de compreender as diferentes hipóteses de diagnóstico diferencial, além de realizar a conduta adequada para o estabelecimento do diagnóstico e do tratamento. Os processos proliferativos não neoplásicos são lesões caracterizadas por proliferação celular secundária a um processo inflamatório desencadeado pela ação de irritantes locais sobre a mucosa bucal (SAPP *et al.*, 1997; NEVILLE *et al.*, 2004). Os processos proliferativos não neoplásicos mais comuns são hiperplasia fibrosa focal (fibroma traumático) granuloma piogênico, fibroma ossificante periférico e lesão periférica de células gigantes (BUCHNER *et al.*, 1977; SAPP *et al.*, 1997; NEVILLE *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2007). Na atual classificação das doenças periodontais (ARMITAGE, 1999), apenas o granuloma piogênico possui classificação diferenciada como doença gengival modificada por fatores sistêmicos.

O objetivo desta revisão é abordar a etiopatogenia, as características clínicas, as características histopatológicas, o tratamento e o prognóstico dos processos proliferativos não neoplásicos gengivais, enfatizando a importância

do conhecimento destes processos patológicos para a prática clínica odontológica.

Hiperplasia fibrosa focal

A hiperplasia fibrosa focal representa uma reação hiperplásica a agentes irritantes locais (trauma, biofilme dental, cálculo, restaurações com margens irregulares) que desencadeiam um processo inflamatório caracterizado pela proliferação de fibroblastos e pela intensa deposição de fibras colágenas (SAPP *et al.*, 1997).

A hiperplasia fibrosa focal acomete principalmente mulheres, na quarta década de vida (BUCHNER *et al.*, 1977; KFIR *et al.*, 1980). Pode acometer qualquer região da mucosa bucal, sendo mais comumente observada na mucosa jugal, ao longo da linha de oclusão (NEVILLE *et al.*, 2004). Quando acomete a gengiva, sua localização é mais comum é na região anterior da maxila, usualmente na papila interdental (BUCHNER *et al.*, 1977; KFIR *et al.*, 1980). Manifesta-se como um nódulo, sésil ou pediculado, de consistência firme, cor frequentemente similar a da mucosa normal adjacente, geralmente assintomático e com diâmetro menor que 2 centímetros (Figura 1a) (BUCHNER *et al.*, 1977; KFIR *et al.*, 1980).

Histologicamente, a lesão caracteriza-se pela proliferação de fibroblastos associados à deposição de feixes de fibras colágenas dispostos em várias direções, além da presença de infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (Figura 2a) (KFIR *et al.*, 1980; ZHANG *et al.*, 2007). A lesão é coberta por epitélio estratificado pavimentoso que pode mostrar-se ulcerado em áreas traumatizadas (KFIR *et al.*, 1980).

Seu tratamento envolve excisão cirúrgica completa incluindo o periósteo, além da remoção de fatores irritantes (SAPP *et al.*, 1997; NEVILLE *et al.*, 2004; HOLMSTRUP e REIBEL, 2005; ZAREI *et al.*, 2007).

Granuloma piogênico

O granuloma piogênico é um processo proliferativo não neoplásico de pele e mucosas caracterizado pela proliferação reacional de células endoteliais, sendo a mucosa bucal um dos sítios mais afetados (ANGELOPOULOS, 1971; SAPP *et al.*, 1997). Esta nomenclatura foi sugerida por Kerr (1951) e é a mais comumente aceita pela literatura, apesar de não expressar seus aspectos clínicos e histopatológicos (ANGELOPOULOS, 1971). Representa uma resposta tecidual exacerbada a um irritante não específico local (biofilme dental, cálculo ou margem de restaurações em excesso) ou injúria traumática que desencadeiam um processo inflamatório (BHASKAR E JACOWAY, 1966; KFIR *et al.*, 1980; JAFARZADEH *et al.*, 2006). YUAN *et al.* (2000) demonstraram que, em comparação com tecido gengival normal e amostras de tecido com periodontite, o granuloma piogênico apresenta maior expressão de fatores angiogênicos (fator de crescimento endotelial vascular - VEGF) e menor expressão de fatores anti-angiogênicos (angiostatina). Os autores concluíram que a patogenia da lesão está relacionada a um descontrole homeostático entre inibidores e estimuladores da angiogênese.

O granuloma piogênico é o processo proliferativo não neoplásico mais frequentemente encontrado na gengiva (BHASKAR e LEVIN, 1973; BUCHNER *et al.*, 1977; FORTES *et al.*, 2002; AL-KHATEEB e ABABNEL, 2003; ZAREI *et al.*, 2006; SHAMIM *et al.*, 2008). Ocorre predominantemente em mulheres jovens na segunda e terceira décadas de vida (BHASKAR e LEVIN, 1973;

BUCHNER *et al.*, 1977; KFIR *et al.*, 1980; FORTES *et al.*, 2002; AL-KHATEEB e ABABNEL, 2003; ZAREI *et al.*, 2006; SHAMIM *et al.*, 2008), possivelmente pelo efeito vascular dos hormônios femininos (JAFARZADEH *et al.*, 2006).

Frequentemente, o granuloma piogênico acomete a gengiva de mulheres grávidas, associado à elevação nos níveis de estrógeno e progesterona, situação na qual é denominado tumor gravídico ou granuloma gravídico (FABE, 1954; DÍAZ-GUZMÁN e CASTELLANOS-SUÁREZ, 2004). Díaz-Guzmán e Castellanos-Suárez (2004) verificaram que granuloma piogênico apresenta uma prevalência significativamente maior em grávidas (2,15%) que em não grávidas (0,06%). Ojanotko-Harri *et al.* (1991) avaliaram a concentração de progesterona em granulomas piogênicos de mulheres grávidas e demonstraram que o metabolismo deste hormônio foi baixo nas amostras, permitindo assim que a progesterona ativa permanecesse livre nestes tecidos. Como a progesterona é imunossupressora, estes autores concluíram que os níveis de progesterona ativa alteram a reação inflamatória ao biofilme dental prevenindo uma rápida inflamação aguda e criando uma inflamação crônica exacerbada, que poderia predispor o desenvolvimento do granuloma piogênico.

Seu aspecto clínico é de um nódulo, pediculado ou sésil, com uma superfície lisa, lobulada ou papilar, comumente ulcerada e que tende ao sangramento espontâneo ou sobre leve trauma (ANGELOPOULOS, 1971; KFIR *et al.*, 1980) (Figura 1b). Sua coloração pode variar do vermelho ao rosa, dependendo da colagenização do tecido (ANGELOPOULOS, 1971; KFIR *et al.*, 1980). Aproximadamente 75% dos casos acometem a gengiva (BHASKAR e JACOWAY, 1966), principalmente na papila interdental da região superior

anterior vestibular (ANGELOPOULOS, 1971). Entretanto, pode acometer também outros sítios da mucosa bucal como lábio, língua, palato e mucosa jugal (BHASKAR e JACOWAY, 1966; ANGELOPOULOS, 1971). Estes processos proliferativos possuem um tamanho que pode variar de 3 mm a 6 cm (BHASKAR e JACOWAY, 1966; BHASKAR e LEVIN, 1973).

Histologicamente, caracteriza-se pela presença de proliferação endotelial associada à formação de espaços vasculares (Figura 2b). Proliferação de células endoteliais e de vasos sanguíneos organizados em lóbulos pode também ser observada. Células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares estão presentes na lâmina própria. O granuloma piogênico é recoberto por epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado ou paraqueratinizado que freqüentemente encontra-se ulcerado (BHASKAR e JACOWAY, 1966; BHASKAR e LEVIN, 1973; KFIR *et al.*, 1980; SAPP *et al.*, 1997; NEVILLE *et al.*, 2004).

Seu tratamento envolve a remoção cirúrgica (BHASKAR e LEVIN, 1973; KFIR *et al.*, 1980) e recidiva pode ocorrer em aproximadamente 15% dos casos (BHASKAR e JACOWAY, 1966; BHASKAR e LEVIN, 1973). Fatores irritantes como placa, cálculo e restaurações deficientes devem ser removidos (NEVILLE *et al.*, 2004; HOLMSTRUP e REIBEL, 2005; ZAREI *et al.*, 2007). Para Bosco *et al.* (2006), a remoção cirúrgica poderá incluir áreas sadias e o periósteo, causando recessão periodontal. Estes autores ressaltam que cirurgia plástica periodontal poderá ser realizada concomitantemente a fim de se evitar alterações estéticas. Em mulheres grávidas, o granuloma piogênico apresenta tendência a regredir após o parto. Isto está provavelmente relacionado à

diminuição da síntese de VEGF observada na parturiente após o nascimento (YUAN e LIN, 2004).

Fibroma ossificante periférico

O fibroma ossificante periférico também denominado de fibroma cemento ossificante periférico é um processo proliferativo caracterizado pela proliferação de tecido conjuntivo fibroso associado à deposição de osso e de material mineralizado semelhante a cimento (BUCHNER e HANSEN, 1987; SAPP *et al.*, 1997). De patogênese incerta, acredita-se que estas lesões estejam associadas à proliferação reacional de células do tecido conjuntivo gengival, periósteo ou do ligamento periodontal com potencial osteogênico (BUCHNER e HANSEN, 1987; YANG *et al.*, 1993; SAPP *et al.*, 1997). Representa também uma lesão reacional a irritantes locais, principalmente biofilme dental (SAPP *et al.*, 1997; NEVILLE *et al.*, 2004).

Esta lesão é mais comum em adolescentes e adultos jovens, na segunda e terceira décadas de vida, com maior predileção pelo sexo feminino (BUCHNER *et al.*, 1977; KFIR *et al.*, 1980; BUCHNER e HANSEN, 1987; FORTES *et al.*, 2002).

O fibroma ossificante periférico acomete exclusivamente a gengiva e o rebordo alveolar (BUCHNER e HANSEN, 1987; FORTES *et al.*, 2002). As localizações mais frequentemente relatadas são a região anterior da maxila (BUCHNER e HANSEN, 1987) e a região posterior da maxila (KFIR *et al.*, 1980). Desenvolve-se na maioria dos casos na papila interdental e pode promover migração dental (BUCHNER e HANSEN, 1987). Caracteriza-se pela presença de um nódulo, de base pediculada ou sésil, podendo ocorrer na forma lobulada (Figura 1c) (BUCHNER e HANSEN, 1987; KFIR *et al.*, 1980;

FORTES *et al.*, 2002). Possui cor que varia de rosada, similar à da gengiva, a levemente avermelhada, e sua superfície pode apresenta-se ulcerada (BUCHNER e HANSEN, 1987; KFIR *et al.*, 1980; FORTES *et al.*, 2002). Geralmente apresentam-se como lesões menores que 1 cm, podendo contudo atingir tamanhos maiores (BUCHNER e HANSEN, 1987). O exame radiográfico pode ocasionalmente demonstrar a presença de radiopacidades no tecido mole da lesão (SAPP *et al.*, 1997).

Histologicamente, a lesão apresenta numerosos fibroblastos fusiformes ou ovóides, com núcleos frequentemente volumosos e vesiculares. Estas células podem ser permeadas por quantidade variável de fibras colágenas, trabéculas de osteóide, trabéculas de osso maduro, áreas de calcificação distrófica e corpos mineralizados ovóides semelhantes a cimento (Figura 2c). Infiltrado inflamatório composto predominantemente de linfócitos e plasmócitos pode também ser observado (BUCHNER e HANSEN, 1987). YANG *et al.* (1993) demonstraram imunomarcagem para proteína morfogenética do osso ou BMP (bone morphogenetic protein) em 60% dos casos de fibroma ossificante periférico.

O tratamento consiste na excisão cirúrgica incluindo o perióstio (ZAREI *et al.*, 2007). Recorrência pode ocorrer em cerca de 11% (ZAREI *et al.*, 2007) a 16% dos casos (BUCHNER e HANSEN, 1987). Como forma de minimizar os defeitos gengivais produzidos pela remoção cirúrgica, Walters *et al.* (2001) sugerem retalhos deslocados lateralmente e retalhos reposicionados coronariamente com ou sem enxerto de tecido conjuntivo.

Lesão periférica de células gigantes

A lesão periférica de células gigantes é um processo proliferativo caracterizado pela presença de células mononucleares associadas a células gigantes multinucleadas, sendo uma lesão reativa originária do periósteo ou do ligamento periodontal, usualmente como resultado de fatores irritantes locais como biofilme dental, cálculo, trauma local e extração dentária (GIANSANTI e WALDRON, 1969; BHASKAR *et al.*, 1971; BODNER *et al.*, 1997; SAPP *et al.*, 1997; MOTAMEDI *et al.*, 2007). A lesão periférica de células gigantes também têm sido identificada em áreas ao redor de implantes dentários (HIRSHBERG *et al.*, 2003).

A lesão periférica de células gigantes é um processo proliferativo que ocorre exclusivamente na gengiva e em rebordos edêntulos (GIANSANTI e WALDRON, 1969; BHASKAR *et al.*, 1971; KFIR *et al.*, 1980; KATSIKERIS *et al.*, 1988; MOTAMEDI *et al.*, 2007). Sua frequência de localização é maior na região posterior da mandíbula seguida pela região anterior da mandíbula (BHASKAR *et al.*, 1971; KATSIKERIS *et al.*, 1988; HIRSHBERG *et al.*, 2003). Embora a predileção pelo sexo feminino tenha sido descrita (GIANSANTI e WALDRON, 1969; BUCHNER *et al.*, 1977; KATSIKERIS *et al.*, 1988), alguns estudos têm demonstrado a não predileção pelo gênero (BHASKAR *et al.*, 1971; KFIR *et al.*, 1980; MOTAMEDI *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007). A lesão acomete indivíduos de todas as idades, com média variando entre 30 a 40 anos (GIANSANTI e WALDRON, 1969; BHASKAR *et al.*, 1971; BHASKAR e LEVIN, 1973; BUCHNER *et al.*, 1977; KFIR *et al.*, 1980; KATSIKERIS *et al.*, 1988; ZHANG *et al.*, 2007).

O aspecto clínico da lesão é de um nódulo, pediculado ou sésil, de consistência firme, com coloração que vai do vermelho ao arroxeadado (Figura 1d) (BHASKAR *et al.*, 1971; KFIR *et al.*, 1980; KATSIKERIS *et al.*, 1988). As lesões são geralmente menores que 2cm, mas podem atingir tamanhos maiores (KFIR *et al.*, 1980; BODNER *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2007). Separação dos dentes pode ocorrer, bem como erosão óssea detectável radiograficamente (BHASKAR e LEVIN, 1973).

Com relação ao aspecto histológico, a lesão periférica de células gigantes apresenta, na lâmina própria, coleção bem delimitada de numerosas células mononucleares permeadas por células gigantes multinucleadas (Figura 2d) (GIANSANTI e WALDRON, 1969; BHASKAR *et al.*, 1971; BHASKAR e LEVIN, 1973; BUCHNER *et al.*, 1977; KFIR *et al.*, 1980; KATSIKERIS *et al.*, 1988; ZHANG *et al.*, 2007). As células mononucleares podem ser ovais ou fusiformes e apresentam núcleo arredondado e vesicular com nucléolo proeminente (KATSIKERIS *et al.*, 1988). As células gigantes multinucleadas podem exibir citoplasma eosinofílico e núcleos picnóticos (Figura 2d), bem como citoplasma levemente basofílico com núcleos volumosos, ovóides, vesiculares e nucléolos proeminentes (BHASKAR *et al.*, 1971; KATSIKERIS *et al.*, 1988). Estas células também podem estar em íntima relação com espaços vasculares mal definidos e numerosos capilares em desenvolvimento, principalmente na periferia da lesão (BHASKAR *et al.*, 1971; KFIR *et al.*, 1980; KATSIKERIS *et al.*, 1988). Áreas hemorrágicas com deposição de hemossiderina também podem ser vistos na maioria dos casos (GIANSANTI e WALDRON, 1969; BHASKAR *et al.*, 1971; KFIR *et al.*, 1980; KATSIKERIS *et al.*, 1988). Infiltrado inflamatório de linfócitos, plasmócitos e, ocasionalmente,

histiócitos está presente na maior parte dos casos, com intensidade que geralmente varia de leve a moderado (KATSIKERIS *et al.*, 1988). Leucócitos polimorfonucleares também podem ser observados, geralmente associados a áreas de ulceração (KATSIKERIS *et al.*, 1988). Osso maduro ou osteóide pode ser visualizado em aproximadamente metade das lesões (KATSIKERIS *et al.*, 1988). A lesão é recoberta por epitélio estratificado pavimentoso que ocasionalmente pode se apresentar ulcerado (GIANSANTI e WALDRON, 1969; KATSIKERIS *et al.*, 1988).

Bonetti *et al.* (1990) demonstraram que a maioria das células multinucleadas e ocasionais células mononucleares de lesão periférica de células gigantes exibiram imunomarcagem para marcadores de osteoclastos. Demonstraram também que poucas células mononucleares e nenhuma multinucleada exibiu imunomarcadores para macrófagos. De acordo com os autores, a origem da lesão seria de células precursoras de osteoclastos indiferenciadas com características imunofenotípicas diferentes de macrófagos. Em estudo similar, Tiffée e Aufdemorte (1997), confirmaram que a maioria das células gigantes multinucleadas (99,26%) possuía imunomarcagem citoplasmática para marcadores exclusivos de osteoclastos e que 38% também exibiam marcação específica para macrófagos. Segundo os autores, a lesão parece se originar de uma linhagem de macrófagos/histiócitos com aspectos intermediários entre osteoclastos e macrófagos. Este fato poderia explicar a reabsorção óssea observada em algumas lesões.

Seu tratamento consiste na remoção cirúrgica, incluindo o periósteo, e eliminação dos fatores locais e irritantes (GIANSANTI e WALDRON, 1969; BHASKAR e LEVIN, 1973; KFIR *et al.*, 1980; KATSIKERIS *et al.*, 1988). A

recorrência é relativamente baixa, acometendo cerca de 5 a 10% dos casos (GIANSANTI e WALDRON, 1969; BHASKAR e LEVIN, 1973; KATSIKERIS *et al.*, 1988). Enxertos de tecido conjuntivo aliado a retalhos reposicionados podem ser utilizados durante a biópsia para minimizar o defeito gengival produzido (SAHINGUR *et al.*, 2004).

CONCLUSÕES

Os processos proliferativos não neoplásicos gengivais são lesões relativamente comuns e o conhecimento de suas características clínicas, características histopatológicas, tratamento e prognóstico é importante para a prática clínica odontológica. A hiperplasia fibrosa focal, o granuloma piogênico, o fibroma ossificante periférico e a lesão periférica de células gigantes apresentam características clínicas em comum e seu diagnóstico diferencial deve ser realizado através do exame anatomopatológico. O tratamento adequado destas lesões pode diminuir a ocorrência de recidivas e de defeitos estéticos periodontais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Løe H, Ånerud Å, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man: Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 431-440.
2. Gjermo P, Rösing CK, Susin C, Oppermann R. Periodontal diseases in Central and South America. *Periodontol 2000* 2002; 29: 70-78.
3. Stablein MJ, Silverglade LB. Comparative analysis of biopsy specimens from gingival and alveolar mucosa. *J Periodontol* 1985; 56: 671-676.
4. Sapp JP, Eversole LR, Wysock GP. Connective tissue lesions. In: *Contemporary oral and maxillofacial pathology*. St. Louis: Mosby; 1997. p.277-318.
5. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Tumores dos tecidos moles. In: *Patologia oral e maxillofacial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p.419-476.
6. Buchner A, Calderon S, Ramon Y. Localized hyperplastic lesions of the gingiva: a clinicalpathological study of 302 lesions. *J Periodontol* 1977; 48: 101-104.
7. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4 (1): 1-5.
8. Kfir Y, Buchner A, Hansen LS. Reactive lesions of the gingival: a clinicalpathological study of 741 cases. *J Periodontol* 1980; 51(11): 655-661.
9. Zhang W, Chen Y, An Z, Geng N, Bao D. Reactive gingival lesions: a retrospective study of 2439 cases. *Quintessence Int* 2007; 38 (2): 103-110.
10. Holmstrup P, Reibel J. Diagnóstico diferencial: tumores e cistos do periodonto. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP, editores. *Tratado de*

- periodontia clínica e implantologia oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p.290-308.
11. Zarei MR, Chamani G, Amanpoor S. Reactive hyperplasia of the oral cavity in Kerman province, Iran: a review of 172 cases. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2007; 45(4): 288-92.
 12. Angelopoulos AP. Pyogenic granuloma of the oral cavity: statistical analysis of its clinical features. *J Oral Surg* 1971; 29: 840-847.
 13. Kerr DA. Granuloma pyogenicum. *Oral Surg, Oral Méd, Oral Pathol* 1951; 4: 158-176.
 14. Bhaskar SN, Jacoway JR. Pyogenic granuloma – clinical features, incidence, histology, and result of treatment: report of 242 cases. *J Oral Surg* 1966; 24: 391-398.
 15. Jafarzadeh H, Sanatkhani M, Mohtasham N. Oral pyogenic granuloma: a review. *J Oral Sci* 2006; 48: 167-175.
 16. Yuan K, Jin YT, Lin MT. The detection and comparison of angiogenesis-associated factors in pyogenic granuloma by immunohistochemistry. *J Periodontol* 2000; 71: 701-9.
 17. Bhaskar SN, Levin MP. Histopathology of the human gingiva (study base on 1269 biopsies). *J Periodontol* 1973; 44: 3-17.
 18. Fortes TMV, Queiroz LMG, Piva MR, Silveira EJD. Estudo epidemiológico de lesões proliferativas não neoplásicas da mucosa oral – análise de 20 anos. *Cienc Odontol Bras* 2002; 5 (3): 54-61.
 19. Al-Khateeb T, Ababneb K. Oral pyogenic granuloma in Jordanians: a retrospective analysis of 108 cases. *J Oral Maxillo Surg* 2003; 61: 1285-88.

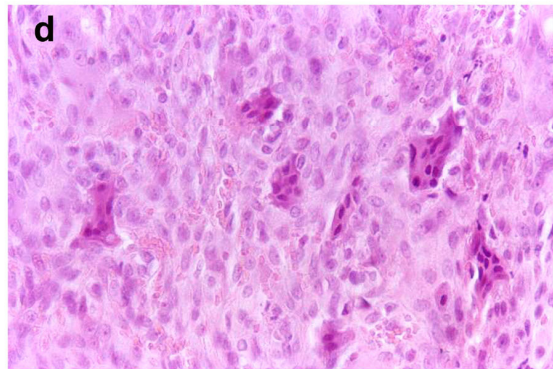
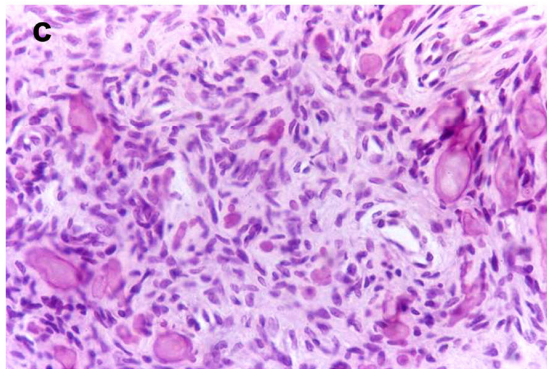
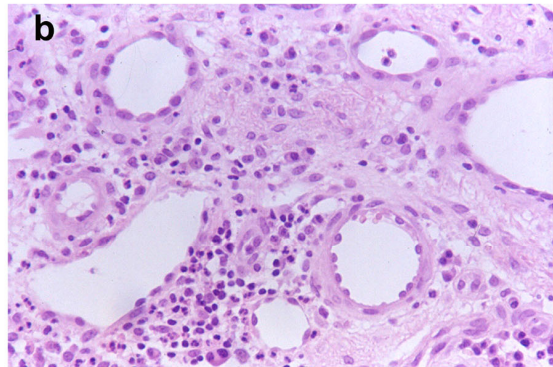
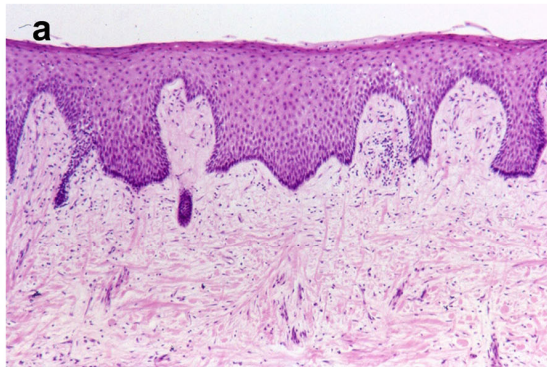
20. Shamim T, Varghese VI, Shameena PM, Sudha S. A retrospective analysis of gingival biopsied lesions in south indian population: 2001-2006. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; 13(7): 414-8.
21. Fabe SS. Pregnancy tumor. *Oral Surg Oral Méd Oral Pathol* 1954; 7: 714-719.
22. Díaz-Guzmán LM, Castellanos-Suárez JL. Lesions of the oral mucosa and periodontal disease behavior in pregnant patients. *Med Oral, Patol Oral, Cir Bucal* 2004; 9: 430-437.
23. Ojanotko-Harri AO, Harri MP, Hurttia HM, Sewón LA. Altered tissue metabolism of progesterone in pregnancy gingivitis and granuloma. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 262-266.
24. Bosco AF, Bonfante S, Luize DS, Bosco JMD, Garcia VG. Periodontal plastic surgery associated with treatment for the removal of gingival overgrowth. *J Periodontol* 2006; 77: 922-928.
25. Yuan K, Lin MT. The roles of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 in the regression of pregnancy pyogenic granuloma. *Oral Diseases* 2004; 10: 179-185.
26. Buchner A, Hansen L. The histomorphologic spectrum of peripheral ossifying fibroma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987; 63: 452-461.
27. Yang L-j, Jin Y, Doi T, Sekine I, Ogawa K, Mori M. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic protein (BMP) in calcifying fibrous epulis. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 406-410.
28. Walters JD, Will JK, Hatfield RD, Cacchillo DA, Raabe DA. Excision and repair of the peripheral ossifying fibroma: a report of 3 cases. *J Periodontol* 2001; 72: 939-944.

29. Giansanti JS, Waldron CA. Peripheral giant cell granuloma: review of 720 cases. *J Oral Surg* 1969; 27: 787-791.
30. Bhaskar SN, Cutright DE, Beasley JD, Perez B. Giant cell reparative granuloma (peripheral): report of 50 cases. *J Oral Surg* 1971; 29: 110-115.
31. Bodner L, Peist M, Gatot A, Fliss DM. Growth potential of peripheral giant cell granuloma. *Oral Surg Oral Méd Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 83: 548-551.
32. Motamedi MHK, Eshghyar N, Jafari SM, Lassemi E, Navi F, Abbas FM, Khalifeh S, Eshkevari PS. Peripheral and central giant cell granulomas of the jaws: a demographic study. *Oral Surg Oral Méd Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 103: 39-43.
33. Hirshberg A, Kozlovsky A, Schwartz-Arad D, Mardinger O, Kaplan I. Peripheral giant cell granuloma associated with dental implants. *J Periodontol* 2003; 74: 1381-1384.
34. Katsikeris N, Kakarantza-Angelopoulou E, Angelopoulos AP. Peripheral giant cell granuloma. Clinicopathologic study of 224 new cases and review of 956 reported cases. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1988; 17: 94-99.
35. Bonetti F, Pelosi G, Martignoni G, Mombello A, Zamboni G, Pea M, Scarpa A, Chilosi M. Peripheral giant cell granuloma: evidence for osteoclastic differentiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 70: 471-475.
36. Tiffée JC, Aufdemorte TB. Markers for macrophage and osteoclast lineages in giant cell lesions of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55: 1108-1112.
37. Sahingur SE, Cohen RE, Aguirre A. Esthetic management of peripheral giant cell granuloma. *J Periodontol* 2004; 75: 487-492.

Figura 1. Apresentação clínica da hiperplasia fibrosa focal (a), do granuloma piogênico (b), do fibroma ossificante periférico (c) e da lesão periférica de células gigantes (d).



Figura 2. Aspecto histopatológico da hiperplasia fibrosa focal (a, HE-100X), do granuloma piogênico (b, HE-400X), do fibroma ossificante periférico (c, HE-400X) e da lesão periférica de células gigantes (d, HE-400X).



ANEXO 3: Artigo de pesquisa que será submetido ao periódico Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal.

Myofibroblasts in focal reactive overgrowths of the gingiva

Running title: Myofibroblasts in gingival overgrowths

Leonardo Silveira Damasceno

Fernanda da Silva Gonçalves

Edson Costa e Silva

Élton Gonçalves Zenóbio

Paulo Eduardo Alencar de Souza

Martinho Campolina Rebello Horta

School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Corresponding author:

Martinho Campolina Rebello Horta

Rua Ceará, 1338, 1101, Funcionários, Belo Horizonte, MG, Brasil

CEP 30150-311

Phone: (+55) 31 33194341

Fax: (+55) 31 33194166

e-mail: martinhohorta@pucminas.br

Summary

Focal reactive overgrowths of the gingiva are lesions characterized by cell proliferation due to inflammatory process triggered by local irritants. The most common are focal fibrous hyperplasia (FFH), peripheral ossifying fibroma (POF), pyogenic granuloma (PG), and peripheral giant cell granuloma (PGCG). Myofibroblasts are differentiated fibroblasts that express alpha smooth muscle actin (α -SMA). These cells synthesize and degrade extracellular matrix components during inflammation and process of tissue repair and remodeling. Consequently, myofibroblasts actively participate in diseases characterized by fibrosis of organs and tissues. Although the presence of myofibroblasts has been reported in hereditary gingival fibromatosis and drug-induced gingival hyperplasia, few studies evaluated its presence in focal reactive overgrowths of the gingiva. Therefore, the aim of this study is to evaluate the presence of myofibroblasts in the main focal reactive overgrowths of the gingiva (FFH, POF, PG, and PGCG). A total of 10 focal fibrous hyperplasia, 10 peripheral ossifying fibroma, 10 pyogenic granuloma, and 10 peripheral giant cell granuloma from archival formalin-fixed, paraffin-embedded specimens were evaluated. 10 samples of normal gingival mucosa were used as a control. Myofibroblasts were identified by immunohistochemical detection of α -SMA, a marker for myofibroblasts. Normal vessel's smooth muscle immunoreactivity was used as a positive control. A light microscopy was used to evaluate the immunostaining results. No myofibroblasts were observed in gingival mucosa. FFH, PG, POF, and PGCG did not also show the presence of myofibroblasts. In conclusion, myofibroblasts were not detected in the focal reactive overgrowths of the

gingiva evaluated, suggesting that these cells do not participate in its pathogenesis.

Key words: myofibroblast, focal fibrous hyperplasia, pyogenic granuloma, peripheral ossifying fibroma, peripheral giant cell granuloma.

Introduction

Focal reactive overgrowths are one of the most common lesions of the oral mucosa (1,2). The gingiva is an important area affected by these lesions (1,3), mainly triggered by chronic inflammation in response to microorganisms in dental plaque (2,4-7). These lesions are composed of one or more of the following connective tissue components: collagen, bone, endothelial cells, and multinucleated giant cells (2). The most common focal reactive overgrowths of the gingival connective tissue are focal fibrous hyperplasia (FFH), peripheral ossifying fibroma (POF), pyogenic granuloma (PG), and peripheral giant cell granuloma (PGCG) (2,3,8). FFH, also known as irritation fibroma, is a focal reactive hyperplasia of fibroblasts with overproduction of collagen (2,3,6). POF is a focal reactive hyperplasia of fibrous connective tissue presenting bone formation besides fibroblasts and collagen production (2,9). PG is a focal reactive growth of granulation tissue with marked proliferation of endothelial cells and blood vessel formation (2,6). PGCG is a focal overgrowth composed of mononuclear and multinucleated giant cells (2,4,7).

Myofibroblasts are differentiated fibroblasts that express alpha smooth muscle actin (α -SMA) and have intermediate characteristics between classic fibroblasts and smooth muscle cells (10-12). Transdifferentiation by transforming growth factor-beta 1 (TGF- β_1) stimulation is its most common origin (12,13). Myofibroblasts synthesize and degrade extracellular matrix components during inflammation and process of tissue repair and remodeling (10,12,14). Therefore, these cells actively participate in diseases characterized by fibrosis of organs and tissues (15,16). Although the presence of myofibroblasts has been reported in hereditary gingival fibromatosis (17) and

drug-induced gingival hyperplasia (18,19) few studies evaluated its presence in focal reactive overgrowths of the gingiva (20-22).

Therefore, the aim of this study is to evaluate the presence of myfibroblasts in the main focal reactive overgrowths of the gingiva (FFH, PG, POF, and PGCG).

Material and Methods

Tissues and samples

This study was approved by the local ethics committee. A total 10 FFH, 10 PG, 10 POF and 10 PGCG from archival formalin-fixed, paraffin-embedded specimens were evaluated. 10 samples of normal gingival mucosa were used as a control.

Immunohistochemistry

Myfibroblasts were identified by immunohistochemical detection of α -SMA, a marker for myfibroblasts. Four μ m sections from the paraffin-embedded samples were used. Tissue sections were dewaxed with xylene, hydrated using graded alcohols, and treated with 0.6% H_2O_2 to eliminate endogenous peroxidase activity. Antigen retrieval was conducted by heating in a 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) for 30 minutes. Subsequently, the anti- α -SMA monoclonal antibody was used (clone 1A4, diluted 1:100; Dako Corporation, Carpinteria, USA). The LSAB+ kit (Dako Corporation, Carpinteria, USA) was used for application of the biotinylated link antibody and peroxidase-labeled streptavidin, according to the manufacturer's instructions. The reactive products were visualized by immersing the sections for 3 min in 0.03% diaminobenzidine solution, containing 2 mM H_2O_2 . The sections were then counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated, and mounted. Normal vessel's smooth

muscle immunoreactivity was used as a positive control. Negative control was determined by omission of the primary antibody.

Immunostaining results

A light microscopy was used to evaluate the immunohistochemical reactions. Alpha smooth muscle actin positive stromal cells, showing cytoplasmatic immunostaining, were considered as myofibroblasts. Myofibroblasts immunostaining was qualitatively classified as negative (0), scanty (1), and dense (2).

Results

No myofibroblasts were observed in FFH (Fig. 1a and b), POF (Fig. 1c and d), PG (Fig. 2a and b), PGCG (Fig. 2c and d), and gingival mucosa used as control.

Discussion

Myofibroblasts are differentiated fibroblasts that have morphologic and immunophenotypic features similar to smooth muscle cells (10,12). In addition to alpha smooth muscle actin, myofibroblasts show immunopositivity for vimentin, non-muscle myosin, and fibronectin (23). It shows a spindle-cell or stellate-cell morphology, eosinophilic cytoplasm and abundant pericellular matrix (23). The cell presents typical ultrastructural features of secreting cells as prominent rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus producing secretion granules, as well as peripheral myofilaments, fibronexus junctions, and gap junctions (23). Myofibroblasts synthesize and secrete cytokines, inflammatory mediators, extracellular matrix proteins (24), matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) (16).

Due to its ability to secrete and degrade extracellular matrix components, myofibroblasts participate in morphogenesis of tissues or organs (24), wound healing (10,12,14), fibrosis of organs and tissues (15,16), and tumor invasion (25).

Despite the relevance of myofibroblasts in diseases characterized by fibrosis (15,16), few studies have evaluated this cell in gingival overgrowths (17-22). In granulation tissue, myofibroblasts disappear by apoptosis after wound healing (12,14). However, during fibrosis, the continuous presence of TGF- β_1 should inhibit myofibroblasts apoptosis (26) resulting in its accumulation, mainly in tissues presenting unremitting inflammation (12,14). It is important to emphasize that TGF- β_1 levels are 100-fold more in gingival inflammatory process as periodontitis (27). In addition, gingival fibroblasts transdifferentiation into myofibroblasts through TGF- β_1 stimulation has been reported (28). Therefore, the evaluation of myofibroblasts in gingival inflammatory lesions as focal reactive overgrowths is required.

FFH is characterized by hyperplasia of fibroblasts with overproduction of collagen (2,3,6). POF is also a hyperplasia of fibrous connective tissue, nevertheless presenting bone formation besides fibroblasts and collagen production (2,9). In this study, no myofibroblasts were detected in FFH and POF. These results are in agreement with previous reports (21,22) and suggest that myofibroblasts are not significant in the pathogenesis of FFH and POF, despite its high fibroblast activity. This should be explained by low TGF- β_1 levels in these lesions or by the presence of myofibroblast inhibitors as interferon-gamma (INF- γ), since its cytokine may inhibit gingival myofibroblast

transdifferentiation (28). To our knowledge, there are no studies concerning TGF- β_1 levels in these lesions.

This is the first study evaluating myofibroblasts in PG. PG is a focal reactive overgrowth with marked proliferation of endothelial cells and blood vessel formation (2,6). Despite its similarity with granulation tissue, an important site of myofibroblasts (12,14), the PG samples evaluated in the present study did not show the presence of these cells.

Even though previous report has shown myofibroblasts in PGCG (20), no myofibroblasts were observed in the PGCG samples evaluated in this study. This divergence should be a consequence of methodological differences, as this study used a histochemical marker for myosin as well as electron microscopy to detect myofibroblasts (20). Another hypothesis is that myofibroblasts should be present sporadically in PGCL, since this report evaluated only 5 samples. It is important to emphasize that PGCG is composed of mononuclear and multinucleated giant cells (2,4,5,7) that show immunohistochemical markers of macrophages and osteoclasts (29). Myofibroblasts have also been detected in central giant cell granuloma (30), a lesion histologically similar to PGCG.

In conclusion, myofibroblasts were not detected in the focal reactive overgrowths of the gingiva evaluated, suggesting that these cells do not participate in its pathogenesis.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (484943/2007-3), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG (CDS-PPM-00119-08), and Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PROBIC) - PUC Minas (PROBIC-2008/2793-1S), Brazil.

The authors wish to thank the invaluable technical assistance provided by Mrs. Maria Reni Gonçalves Moitinha.

References

1. Stablein MJ, Silverglade LB. Comparative analysis of biopsy specimens from gingival and alveolar mucosa. *J Periodontol.* 1985 Nov;56(11):671-676.
2. Sapp JP, Eversole LR, Wysock GP. Connective tissue lesions. In: Sapp JP, Eversole LR, Wysock GP, editors. *Contemporary oral and maxillofacial pathology.* St. Louis: Mosby; 1997. p.277-318.
3. Zhang W, Chen Y, An Z, Geng N, Bao D. Reactive gingival lesions: a retrospective study of 2439 cases. *Quintessence Int.* 2007 Feb;38(2): 103-110.
4. Giansanti JS, Waldron CA. Peripheral giant cell granuloma: review of 720 cases. *J Oral Surg.* 1969; 27:787-791.
5. Bhaskar SN, Cutright DE, Beasley JD, Perez B. Giant cell reparative granuloma (peripheral): report of 50 cases. *J Oral Surg* 1971;29: 110-115.
6. Kfir Y, Buchner A, Hansen LS. Reactive lesions of the gingival: a clinicalpathological study of 741 cases. *J Periodontol.* 1980;51(11): 655-661.
7. Bodner L, Peist M, Gatot A, Fliss DM. Growth potential of peripheral giant cell granuloma. *Oral Surg Oral Méd Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997;83:548-551.
8. Buchner A, Calderon S, Ramon Y. Localized hyperplastic lesions of the gingiva: a clinicalpathological study of 302 lesions. *J Periodontol.* 1977;48:101-104.
9. Buchner A, Hansen L. The histomorphologic spectrum of peripheral ossifying fibroma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987;63:452-461.
10. Gabbiani G, Ryan GB, Majno G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia.* 1971;27(5):549-550.

11. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillesen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against α -smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle cells differentiation. *J Cell Biol.* 1986;103:2787-2796.
12. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:349-363.
13. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993;122(1):103-111.
14. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 2007 Mar;127(3):526-537.
15. Desmoulière A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest.* 2003;83(12):1689-1707.
16. McKaig BC, McWilliams D, Watson SA, Mahida YR. Expression and regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol.* 2003 Apr;162(4):1355-1360.
17. Bitu CC, Sobral LM, Kellermann MG, Martelli-Junior H, Zecchin KG, Graner E, Coletta RD. Heterogeneous presence of myofibroblasts in hereditary gingival fibromatosis. *J Clin Periodontol.* 2006 Jun;33(6):393-400.
18. Dill RE, Iacopino AM. Myofibroblasts in phenytoin-induced hyperplastic connective tissue in the rat and in human gingival overgrowth. *J Periodontol.* 1997 Apr;68(4):375-80.

19. Bullon P, Pugnali A, Gallardo I, Machuca G, Hevia A, Battino M. Ultrastructure of the gingiva in cardiac patients treated with or without calcium channel blockers. *J Clin Periodontol*. 2003;30:682-690.
20. Dayan D, Buchner A, David R. Myofibroblasts in peripheral giant cell granuloma. Light and electron microscopic study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1989 Oct;18(5):258-261. 1989.
21. Lombardi T, Morgan PR. Immunohistochemical characterisation of odontogenic cysts with mesenchymal and myofilament markers. *J Oral Pathol Med*. 1995 Apr;24(4):170-176.
22. Miguel MCC, Andrade ESS, Rocha DAP, Freitas RA, Souza LB. Expressão imuno-histoquímica da vimentina e do HHF-35 em fibroma de células gigantes, hiperplasia fibrosa e fibroma da mucosa oral. *J Appl Oral Sci*. 2003;11(1):77-82.
23. Eyden B. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med*. 2008;12:22-37.
24. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol*. 1999;277:c1-c9.
25. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblast in cancer. *Nature*. 2006;6:392-401.
26. Zhang HY, Phan SH. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1). *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999 Dec;21(6):658-665.
27. Steinsvoll S, Halstensen TS, Schenck K. Extensive expression of TGF- β_1 in chronically-inflamed periodontal tissue. *J Clin Periodontol*. 1999;26:366-373.

28. Sobral LM, Montan PF, Martelli-Junior H, Graner E, Colleta RD. Opposite effects of TGF-beta1 and IFN-gamma on transdifferentiation of myofibroblast in human gingival cell cultures. *J Clin Periodontol*. 2007 May;34(5):397-406.
29. Tiffée JC, Aufdemorte TB. Markers for macrophage and osteoclast lineages in giant cell lesions of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997;55:1108-1112.
30. Vered M, Nasrallah W, Buchner A, Dayan D. Stromal myofibroblasts in central giant cell granuloma of the jaws cannot distinguish between non-aggressive and aggressive lesions. *J Oral Pathol Med*. 2007 Sep;36(8):495-500.

Figure 1 Immunohistochemical reactivity for α -SMA in focal fibrous hyperplasia (FFH) and peripheral ossifying fibroma (POF). Normal vessel's smooth muscle immunoreactivity was used as a positive control. No myofibroblasts were observed in HHF [a and b; original magnification: x100(a) and x200(b)] and POF [c and d; original magnification: x100(c) and x200(d)].

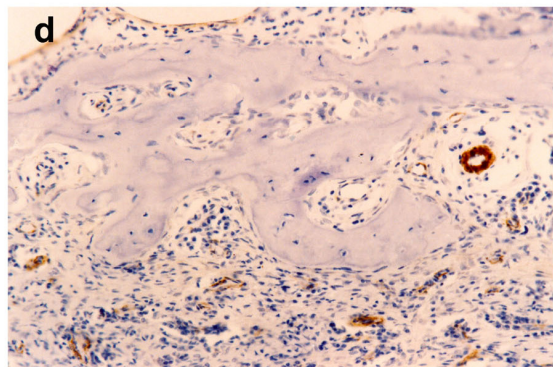
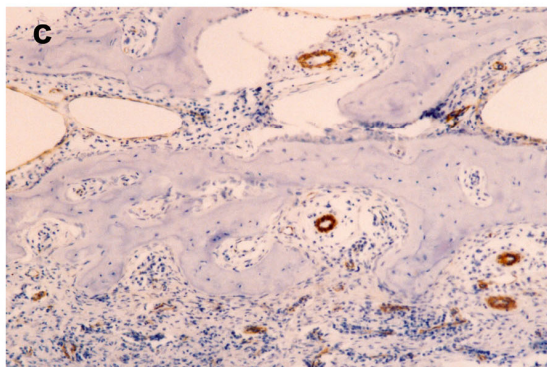
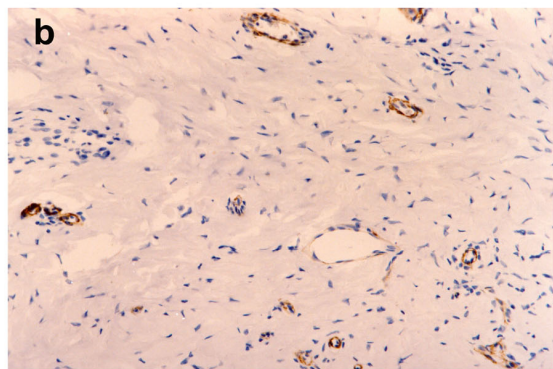
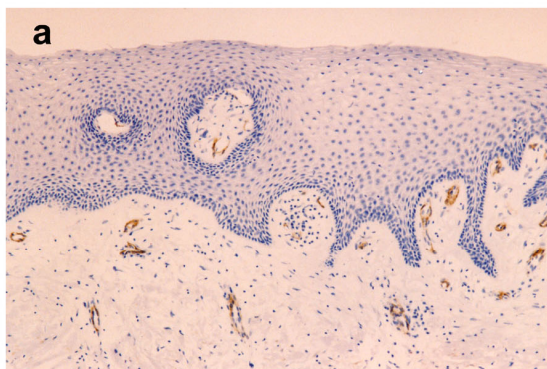
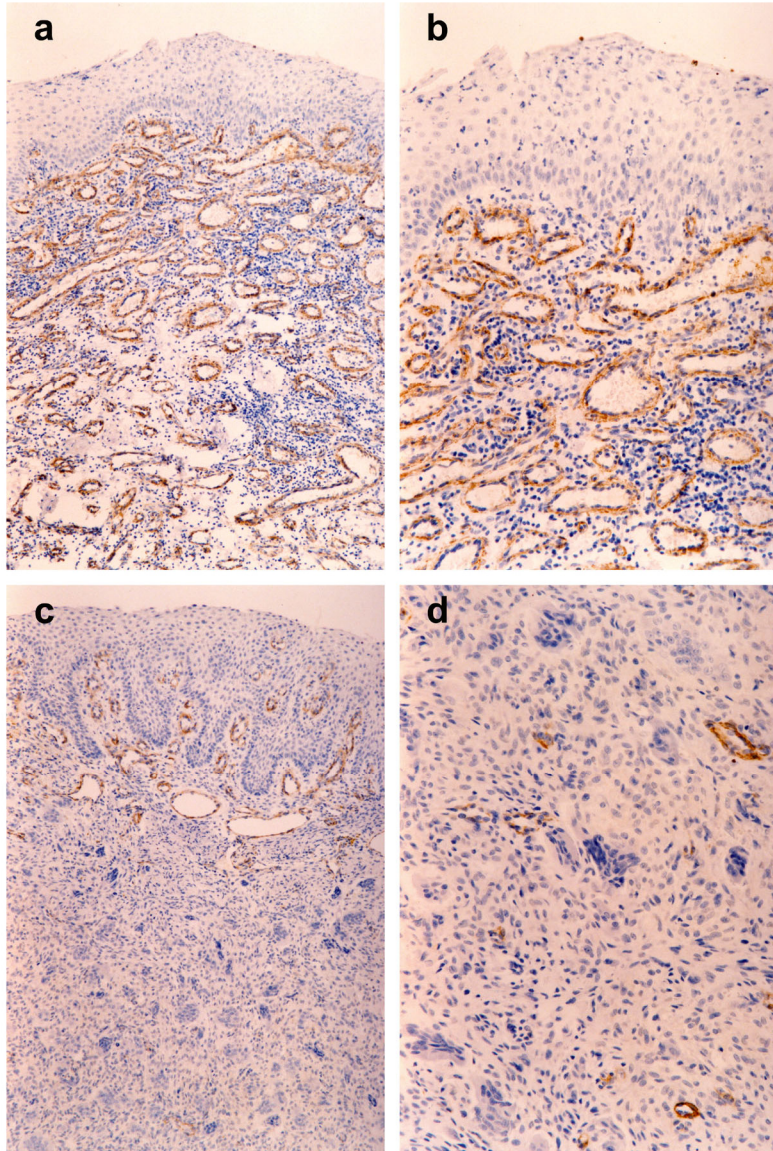


Figure 2 Immunohistochemical reactivity for α -SMA in pyogenic granuloma (PG) and peripheral giant cell granuloma (PGCG). Normal vessel's smooth muscle immunoreactivity was used as a positive control. No myofibroblasts were observed in PG [a and b; original magnification: x100(a) and x200(b)] and PGCG [c and d; original magnification: x100(c) and x200(d)].



ANEXO 4: Dados clínicos das amostras utilizadas

Sexo, idade e localização dos 10 casos de hiperplasia fibrosa focal utilizados neste estudo pertencentes ao arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da PUC Minas.

Amostra	Sexo	Idade	Localização
1	Feminino	25	Gengiva vestibular do 2.3
2	Feminino	21	Gengiva vestibular entre 1.2 e 1.3
3	Masculino	54	Papila interdental entre 2.1 e 2.2
4	Feminino	19	Gengiva vestibular do 1.1
5	Masculino	23	Gengiva inserida vestibular inferior
6	Feminino	46	Gengiva entre 3.2 e 3.3
7	Masculino	35	Gengiva na região do 3.3
8	Masculino	-	Gengiva vestibular 3.1, 3.2 e 3.3
9	Feminino	31	Gengiva entre 1.3 e 1.4
10	Masculino	4.7	Gengiva na região do 3.7

Sexo, idade e localização dos 10 casos de granuloma piogênico utilizados neste estudo pertencentes ao arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da PUC Minas.

Amostras	Sexo	Idade	localização
1	Feminino	-	Gengiva inserida superior direito
2	Feminino	56	Próximo papila interincisiva
3	Feminino	31	Gengiva vestibular inferior
4	Feminino	40	Gengiva palatina entre 1.1 e 2.1
5	Feminino	34	Papila interdental entre 3.3 e 3.4
6	Feminino	24	Gengiva do elemento 1.1
7	Feminino	16	Papila interdental entre 1.1 e 1.2
8	Masculino	11	Gengiva palatina entre 2.1 e 2.2
9	Masculino	-	Papila inferiores anteriores
10	Feminino	57	Lingual do elemento 4.6

Sexo, idade e localização dos 10 casos de fibroma ossificante periférico utilizados neste estudo pertencentes ao arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da PUC Minas.

Amostras	Sexo	Idade	localização
1	Feminino	17	Gengiva inserida do 1.1 e 2.1
2	Feminino	57	Vestibular elemento 3.3
3	Feminino	32	Gengiva vestibular entre 3.4 e 3.5
4	Masculino	32	Papila entre 2.1 e 2.2
5	Feminino	28	Gengiva marginal do 2.1 e 2.2
6	Feminino	49	Gengiva inserida e papila
7	Masculino	16	Gengiva palatina do 1.1 e 2.1
8	Masculino	27	Gengiva inserida 1.6 e 1.7
9	Feminino	22	Gengiva dos dentes 1.1 e 1.2
10	Feminino	40	Gengiva entre 1.2 e 1.3

Sexo, idade e localização dos 10 casos de lesão periférica de células gigantes utilizados neste estudo pertencentes ao arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da PUC Minas.

Amostras	Sexo	Idade	localização
1	Masculino	43	Rebordo região de molares
2	Masculino	9	Entre os dentes 4.1, 4.2 e 8.2
3	Masculino	43	Rebordo região do 4.3
4	Masculino	20	Rebordo região do 1.7 e 1.8
5	Feminino	38	Papila interdental entre 3.3 e 3.4
6	Feminino	24	Palato região do 2.2
7	Masculino	57	Rebordo lingual do 3.1 à 4.3
8	Masculino	-	Rebordo anterior inferior
9	Masculino	7	Rebordo inferior esquerdo
10	Masculino	15	Rebordo alveolar