

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**LARISSA COUTO DE FREITAS**

**IMUNOEXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR EM  
GRANULOMAS PIOGÊNICOS**

**Alfenas/MG  
2022**

**LARISSA COUTO DE FREITAS**

**IMUNOEXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR EM  
GRANULOMAS PIOGÊNICOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Orientador: Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Carine Ervolino de Oliveira

**Alfenas/MG  
2022**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Freitas, Larissa Couto de .

Imunoexpressão de fator de crescimento endotelial vascular em granulomas piogênicos / Larissa Couto de Freitas. - Alfenas, MG, 2022.  
58 f. : il. -

Orientador(a): João Adolfo Costa Hanemann.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Granuloma Piogênico. 2. Fator A de Crescimento do Endotélio Vascular. 3. Indutores da Angiogênese. 4. Boca. I. Hanemann, João Adolfo Costa, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

LARISSA COUTO DE FREITAS

**IMUNOEXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR  
EM GRANULOMAS PIOGÊNICOS**

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Odontologia.

Aprovada em: 17 de fevereiro de 2022

Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alyne Simões Gonçalves

Instituição: Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes

Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **João Adolfo Costa Hanemann, Professor do Magistério Superior**, em 17/02/2022, às 17:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leandro Araújo Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 17/02/2022, às 18:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alyne Simões Gonçalves, Usuário Externo**, em 18/02/2022, às 06:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0673968** e o código CRC **E67B741B**.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por me conceder saúde e sabedoria para que eu pudesse concluir essa etapa em minha vida e por sempre estar ao meu lado, iluminando o meu caminho.

Aos **meus pais**, João Marcos e Lúcia Helena, e **minhas irmãs**, Sabrina, Nathália e Mariana, pelas palavras de apoio, pelo incentivo em todos os momentos da minha vida, pela compreensão, amor e amizade. Sem vocês nada seria possível.

Ao **meu marido**, Rafael, e **meu filho**, Théo, por estarem sempre ao meu lado, por entenderem a minha ausência em muitos momentos, por acreditarem em mim e por não medirem esforços para a concretização dos meus sonhos. A vocês, meu amor eterno!

Agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann** não só por sua orientação na realização dessa dissertação, mas, principalmente, por seu apoio em todos os momentos, pela disponibilidade em compartilhar suas experiências, por sempre estar presente, e pelo exemplo de dedicação, a quem devo minha gratidão.

À **Profa. Dra. Carine Ervolino de Oliveira**, minha co-orientadora, por sua colaboração na realização do meu trabalho.

Aos **docentes** do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Unifal-MG, por todos os conhecimentos transmitidos e pela paciência.

Aos meus colegas discentes por me acolherem e me apoiarem, em especial à **Elisângela de Souza Santos Dias**, pelo companheirismo e amizade.

À **Sra. Maria Ângela Rodrigues** por sua disponibilidade e grande contribuição quando da seleção da amostra.

Às Professoras **Dra. Livia Máris Ribeiro Paranaíba e Dra. Daniela Silva Barroso de Oliveira** por todas as sugestões apresentadas quando do Exame de Qualificação.

À **Sra. Luciana Esteves Pereira** pela presteza e pela disponibilidade em me ajudar sempre.

Ao **Prof. Dr. Denismar Alves Nogueira** pela realização das análises estatísticas.

À **Universidade Federal de Alfenas**, na pessoa do Magnífico Reitor **Prof. Dr. Sandro Amadeu Cerveira**, por abrir as portas para que eu pudesse cursar o mestrado nesta renomada instituição.

À **Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação**, na pessoa da pró-reitora **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Vanessa Bergamin Boralli Marques**, por todas as orientações transmitidas.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas**, na pessoa do seu diretor **Prof. Dr. Alessandro Aparecido Pereira**, por me receber tão generosamente.

À **Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas** da Unifal-MG, na pessoa do **Prof. Dr. Bruno Martini Guimarães**, por proporcionar o ambiente para que esse trabalho fosse desenvolvido.

À **Sra. Rosana Aparecida de Oliveira**, secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Unifal-MG, por me ajudar sempre.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho. Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

A presença de lesões proliferativas na cavidade bucal representa um desafio diagnóstico, devido à grande variedade de condições que podem se apresentar clinicamente de forma semelhante. O granuloma piogênico (GP) é uma dessas lesões proliferativas que representa uma resposta exagerada a uma irritação crônica de baixo grau de intensidade, com intensa proliferação vascular, cuja patogênese ainda continua incerta. Clinicamente, se apresenta como pápula ou nódulo exofítico, eritematoso, de base séssil ou pediculada e sua principal característica microscópica é a presença de intensa proliferação vascular. A angiogênese é um fenômeno bastante complexo regulado por fatores de inibição e de estimulação da proliferação vascular. O desequilíbrio desses fatores leva a uma angiogênese fisiológica ou patológica. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma glicoproteína pró-inflamatória de 45kDa, expressa no citoplasma e membrana de vários tipos celulares, tanto em tecidos normais como em tecidos alterados, tendo um importante papel em etapas críticas do processo angiogênico. Constituiu-se proposição do presente estudo analisar, através de imunohistoquímica, a expressão do VEGF nos granulomas piogênicos, diagnosticados no Laboratório de Anatomopatologia Bucal da UNIFAL-MG, e comparar a imunoexpressão deste marcador com os aspectos clínicos apresentados por estas lesões. Com base nos resultados, podemos concluir que o granuloma piogênico em mucosa bucal é uma condição patológica relativamente incomum. Acomete preferencialmente mulheres, na faixa etária de 20 a 40 anos de idade, leucodermas, e se localiza com maior prevalência na gengiva. Microscopicamente, a grande maioria destas lesões apresenta-se ulcerada e, nestas áreas de ulceração, há uma intensa imunoexpressão do fator de crescimento endotelial vascular.

**Palavras-chave:** Granuloma piogênico, VEGF, indutores da angiogênese, cavidade bucal.

## ABSTRACT

Reactive tumor-like proliferations of the oral cavity are represented by a wide variety of conditions that share similar clinical aspects and therefore may pose a diagnostic challenge. Pyogenic granuloma (PG) is among these lesions and is represented by an exaggerated endothelial response to low-grade chronic irritation leading to intense vascular proliferation, although its exact pathogenesis is still unknown. Clinically, PG presents as an exophytic, erythematous, sessile or pedicled papule or nodule whose main microscopic characteristic is the presence of an intense subepithelial endothelial proliferation within a mixed inflammatory infiltrate. Angiogenesis is a very complex phenomenon regulated by factors that inhibit and stimulate vascular proliferation. The imbalance between these factors lead to physiological or pathological angiogenesis. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is a 45kDa pro-inflammatory glycoprotein expressed in the cytoplasm and membrane of various cell types in normal and transformed tissues, which plays an important role in critical stages of the angiogenic process. Thus, the purpose of this study was to analyze the immunohistochemical expression of VEGF in PGs diagnosed at the Oral Pathology Service of UNIFAL-MG, and to correlate such immunoexpression with the clinical aspects presented by these lesions. Results showed PG to be a relatively uncommon pathological condition affecting the oral mucosa. PG preferentially affects women, aged between 20 and 40 years old, Caucasian, and is more prevalently located in the gingiva. Microscopically, the vast majority of PG were ulcerated and the endothelial cells present in the areas subjacent to ulceration revealed intense immunohistochemical staining with anti-VEGF.

**Keywords:** Pyogenic granuloma, VEGF, angiogenesis inducing agents, oral cavity.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Granuloma piogênico em gengiva apresentando-se como um nódulo, de base pediculada, consistência flácida, coloração avermelhada e com ulceração superficial recoberta por pseudomembrana serofibrinosa.....16
- Figura 2** - Granuloma gravídico acometendo a mucosa palatina em paciente utilizando aparelho ortodôntico.....17
- Figura 3** - Granuloma piogênico apresentando intensa proliferação vascular e vasos sanguíneos hiperêmicos.....19
- Figura 4** - Imunoexpressão intensa do anticorpo VEGF em área de ulceração recoberta por pseudomembrana serofibrinosa em granuloma piogênico.....40
- Figura 5** - Imunoexpressão do anticorpo VEGF em células dispersas em área de coágulo sanguíneo em granuloma piogênico.....40
- Figura 6** - Ausência de imunomarcção do anticorpo VEGF em vasos sanguíneos do granuloma piogênico. Nota-se apenas uma marcação positiva no plasma intravascular.....41
- Figura 7** - Ausência de imunomarcção do anticorpo VEGF no epitélio e intensa imunopositividade na área de ulceração do granuloma piogênico.....41

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Distribuição dos casos de granuloma piogênico segundo a localização no momento do diagnóstico.....34
- Tabela 2** - Distribuição das frequências, idade, recidiva, tamanho e ulceração, após a realização do teste exato de Fisher (\*) e os dados de cor, localização e aspecto clínico após a realização do Teste Qui-quadrado (\*\*) .....37
- Tabela 3** - Distribuição das frequências, idade, gênero, recidiva, cor, tamanho, aspecto clínico e ulceração, após a realização do Teste Qui-quadrado.....39

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Prevalência de granulomas gravídicos nos casos diagnosticados em ambos os gêneros (A) e nos casos diagnosticados apenas no gênero feminino (B).....32
- Gráfico 2** - Distribuição do número de casos de granuloma piogênico por décadas de vida quando do diagnóstico.....33

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Ang-1</b>	Angiopietina-1
<b>Ang-2</b>	Angiopietina-2
<b>bFGF</b>	Basic Fibroblast Growth Factor
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>GP</b>	Granuloma Piogênico
<b>HE</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>HIF-<math>\alpha</math></b>	Hipoxia-inducible factor-alfa
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor- alfa
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	Tumor Necrosis Factor- beta
<b>VEGFR-1</b>	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1
<b>VEGFR-2</b>	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2
<b>VEGFR-3</b>	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>PIGF</b>	Placental Growth Factor
<b>VEGF-A</b>	Vascular Endothelial Growth Factor- A
<b>VEGF-B</b>	Vascular Endothelial Growth Factor- B
<b>VEGF-C</b>	Vascular Endothelial Growth Factor- C
<b>VEGF-D</b>	Vascular Endothelial Growth Factor- D
<b>VEGF-E</b>	Vascular Endothelial Growth Factor- E
<b>VEGF-F</b>	Vascular Endothelial Growth Factor- F
<b>VPF</b>	Vascular Permeability Factor
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	Micrometros

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Questões éticas.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>Casuística e seleção da amostra.....</b>	<b>28</b>
<b>4.3</b>	<b>Análise microscópica qualitativa.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4</b>	<b>Reação Imunohistoquímica.....</b>	<b>29</b>
<b>4.5</b>	<b>Análise da imunexpressão do VEGF.....</b>	<b>30</b>
<b>4.6</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>
	<b>APÊNDICE 1: Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Unifal-MG .....</b>	<b>53</b>
	<b>APÊNDICE 2: Formulário de coleta de dados.....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A presença de lesões na mucosa bucal geralmente representa um desafio, devido à grande variedade de condições patológicas que podem acometer a região. Um grupo importante de lesões na cavidade bucal são aquelas que se desenvolvem em resposta a uma injúria crônica que leva a resposta tecidual exuberante, sendo o granuloma piogênico (GP) um representante desse grupo (KAMAL et al., 2012).

O granuloma piogênico é um processo proliferativo não-neoplásico, localizado, que acomete principalmente a gengiva e com predileção pelo gênero feminino. Está presente em cerca de 5% das gestações, em especial após o primeiro trimestre. Sua etiologia e patogênese ainda são incertas, porém, parecem estar relacionadas a alterações hormonais, ao uso de alguns fármacos e à presença de irritação crônica local de baixa intensidade ou trauma, como cálculo dental (GIBLIN et al., 2007; ANDRIKOPOULOU et al., 2013; TRENTO et al., 2014).

Clinicamente, o GP se apresenta como pápula ou nódulo exofítico, séssil ou pediculado, com superfície lisa ou lobulada, eritematoso, que pode sangrar facilmente, podendo ou não ser assintomático (GONÇALES et al., 2010; BANJAR et al., 2020). Há uma predileção de desenvolvimento do granuloma piogênico em mulheres jovens, durante a puberdade, em mulheres que fazem uso de contraceptivos orais e em gestantes. Quando do acometimento de mulheres grávidas, a lesão passa a ser denominada granuloma gravídico e, geralmente, regride após o parto, o que leva ao entendimento de que os hormônios esteroides femininos possam fazer parte de sua patogênese, tendo duplo efeito, pois aumentam a expressão de fatores angiogênicos e diminuem a apoptose celular, sem, no entanto, haver evidência direta sobre tal influência (MEIJER-JORNA et al., 2012).

Microscopicamente, a lesão é revestida por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, podendo apresentar ulceração superficial revestida por uma pseudomembrana serofibrinosa, sendo que este padrão pode ser alterado de acordo com o estágio de evolução da lesão. O tecido conjuntivo exibe uma proliferação endotelial semelhante ao tecido de granulação, além de uma intensa proliferação vascular, o que é um importante achado histopatológico, sugerindo forte atividade

angiogênica (BRAGADO et al., 1999; FREITAS et al., 2005; JAFARZADEH; SANATKHANI; MOHTASHAM, 2006; GONÇALES et al., 2010; SHARMA et al., 2019).

Com relação ao tratamento, embora muitas modalidades sejam propostas, a excisão cirúrgica conservadora, associada à remoção do agente irritante, é o tratamento de escolha, apresentando um índice de recidiva que varia de 0% a 16% (GONÇALES et al., 2010; GORDON-NUNEZ et al., 2010).

Devido a exuberante proliferação vascular observada histologicamente nas lesões de GP, a angiogênese se torna um processo a ser investigado para melhor compreender a patogênese da lesão. É sabido que a angiogênese é um processo extremamente complexo, cujo mecanismo de regulação mais aceito é aquele com participação de fatores inibidores e estimuladores da proliferação celular endotelial. Dentre os vários marcadores angiogênicos já estudados, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) merece atenção por estar associado à estimulação da proliferação celular endotelial, permeabilidade vascular e, conseqüentemente, a promoção da angiogênese.

O VEGF desempenha importante papel na regulação do desenvolvimento vascular fisiológico, sendo que tanto a diminuição quanto o aumento de seus níveis trazem alteração na formação vascular. O aumento da expressão do fator angiogênico, além de estimular a proliferação endotelial, também diminui a apoptose celular, sendo que essa expressão aumentada pode ocorrer em situações fisiológicas, como o reparo tecidual a danos de qualquer natureza, ou em situações patológicas, como crescimento tumoral, metástases, hemangiomas e GP (YUAN; JIN; LIN, 2000; LU et al., 2018; MELINCOVICI et al., 2018; DU et al., 2020).

Estudos de lesões bucais como o hemangioma, o carcinoma de células escamosas e, especialmente, o GP demonstraram que há um aumento da expressão de VEGF durante o desenvolvimento dessas lesões. Quando se trata de GP, esse aumento encontra-se, principalmente, no citoplasma de macrófagos e fibroblastos, fato que pode ser explicado pela natureza hiperplásica da lesão e pela presença de infiltrado inflamatório. Em contrapartida, análise da expressão de VEGF em tecido gengival saudável ou com periodontite demonstram que não há expressão significativa do fator angiogênico. Observou-se, ainda, uma maior expressão de VEGF em lesões de GP

encontradas em gestantes, bem como sua diminuição após o parto, o que explica a influência dos hormônios esteroides femininos na produção desse fator angiogênico (RAVI et al., 1998; YUAN; LIN, 2004; FREITAS et al., 2005; ANDRIKOPOULOU et al., 2013; CANIVELL-ZABALETA et al., 2018; MCNAMARA; KALMAR, 2019).

Os resultados encontrados na literatura sobre a expressão de VEGF no GP apoiam a hipótese de sua relação com a patogênese da lesão, porém, não podemos esquecer que outros fatores etiológicos como trauma, infecção e alterações hormonais intensificam a resposta tecidual a esse agente angiogênico (FREITAS et al., 2005; JAFARAZED et al., 2006; TRENTO et al., 2014; PARK et al., 2017, BANJAR et al., 2020).



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Proliferações de tecido mole, que ocorrem na cavidade bucal, geralmente representam um desafio diagnóstico, devido ao grande número de lesões que se apresentam clinicamente da mesma forma, podendo representar desde variações de estruturas anatômicas normais, inflamações, cistos, anomalias de desenvolvimento e neoplasias verdadeiras até hiperplasias reativas, sendo estas últimas, lesões que se desenvolvem como resposta exuberante a um estímulo crônico, tendo o GP como um representante desse grupo (COSTA et al., 2012; KAMAL et al., 2012).

O granuloma piogênico é uma proliferação vascular benigna, não neoplásica, que pode ser encontrado na literatura com uma diversidade de outros nomes, como *granuloma pediculatum benignum*, *épolis vascular*, granuloma hemangiomaso, doença de Crocker e Hartzell, hemangioma capilar lobular e tumor ou granuloma gravídico, quando ocorre durante a gestação (TRENTO et al., 2014; PARK et al., 2017; SHARMA et al., 2019; BANJAR et al., 2020). Apesar de ser a denominação atual, o termo granuloma piogênico é considerado impróprio, uma vez que a lesão não se trata de um granuloma verdadeiro e não há produção de secreção purulenta e, também, não há relação da lesão com infecção (JAFARZADEH; SANATKHANI; MOHTASHAM, 2006; GONÇALES et al., 2010; DIAS et al., 2020).

O GP representa uma resposta exagerada a uma irritação crônica de baixa intensidade, com intensa proliferação vascular, embora sua patogênese ainda não seja bem conhecida (JAFARZADEH; SANATKHANI; MOHTASHAM, 2006; GORDON-NUNEZ et al., 2010; COSTA et al., 2012). Tem predileção pela região da cabeça e do pescoço (62,4%), seguida pelo tronco (19,7%) e pelas extremidades superiores (12,9%) e inferiores (5%). Dentro da boca, a gengiva é a localização mais comum, mas também pode acometer lábio, língua, mucosa bucal e palato (SARAVANA, 2009; PARK et al., 2017).

Granuloma gravídico ou *épolis gravídico* é a denominação dada ao GP que acomete mulheres grávidas, sendo uma lesão que ocorre em 5% das gestantes, com maior ocorrência nos segundo e terceiro trimestres e com incidência aumentada no sétimo mês de gestação (YUAN; LIN, 2004; GIBLIN et al., 2007; TRENTO et al., 2014).

Os mecanismos patogênicos do seu desenvolvimento ainda não são muito conhecidos, apesar de sua alta incidência, e a lesão já foi, inclusive, considerada como infecção fúngica em cavalos, mesmo sem evidências científicas, porém, hoje é sabido que se trata de resposta exagerada do tecido a irritantes locais. Atualmente, as causas mais associadas ao desenvolvimento do GP são a presença de irritantes locais, como uso de próteses mal adaptadas, impactação de alimentos, placa e cálculo dentário, inflamação gengival, histórico prévio de exodontia, presença de hábitos parafuncionais e fatores clínicos como alterações hormonais, em especial dos hormônios esteroides femininos, uso de alguns medicamentos, como a ciclosporina, e presença de lesões vasculares pré-existentes (JAFARZADEH; SANATKHANI; MOHTASHAM, 2006; TRENTO et al., 2014; PARK et al., 2017; BANJAR et al., 2020).

Foi demonstrado que alguns microorganismos como a *Bartonella henselae*, a *Bartonella quintana* e o herpes vírus humano tipo 8 foram encontrados em outros tumores vasculares, podendo estar relacionados ao desenvolvimento do GP, embora não existam evidências que confirmem a presença de agente infeccioso nos mesmos (JAFARZADEH; SANATKHANI; MOHTASHAM, 2006).

Há, também, evidências de que os hormônios esteroides femininos alterem a resposta tecidual a irritantes locais, como a placa bacteriana, portanto, não apenas mulheres grávidas têm maior predisposição ao desenvolvimento da lesão, mas também as mulheres na puberdade e as que fazem uso de contraceptivos orais, porém apenas a alteração hormonal não é capaz de desenvolvê-la, uma vez que seu desenvolvimento se dá apenas em regiões onde há um irritante local e a remoção desse fator irritativo é suficiente para preveni-la (YUAN et al., 2002; ANDRIKOPOULOU et al., 2013; TRENTO et al., 2014).

Clinicamente, o GP se apresenta como pápula ou nódulo exofítico, séssil ou pediculado, com superfície lisa ou lobulada, eritematoso, que pode sangrar facilmente, podendo ou não ser assintomático, sendo a gengiva afetada em 75% dos casos (GONÇALES et al., 2010; COSTA et al., 2012; BANJAR et al., 2020). Além dessas características, a lesão ainda pode apresentar superfície ulcerada e friável, podendo estar coberta por pseudomembrana serofibrinosa amarela e apresentando coloração que varia de rosa ou vermelho a roxo ou marrom, sendo que lesões mais jovens têm

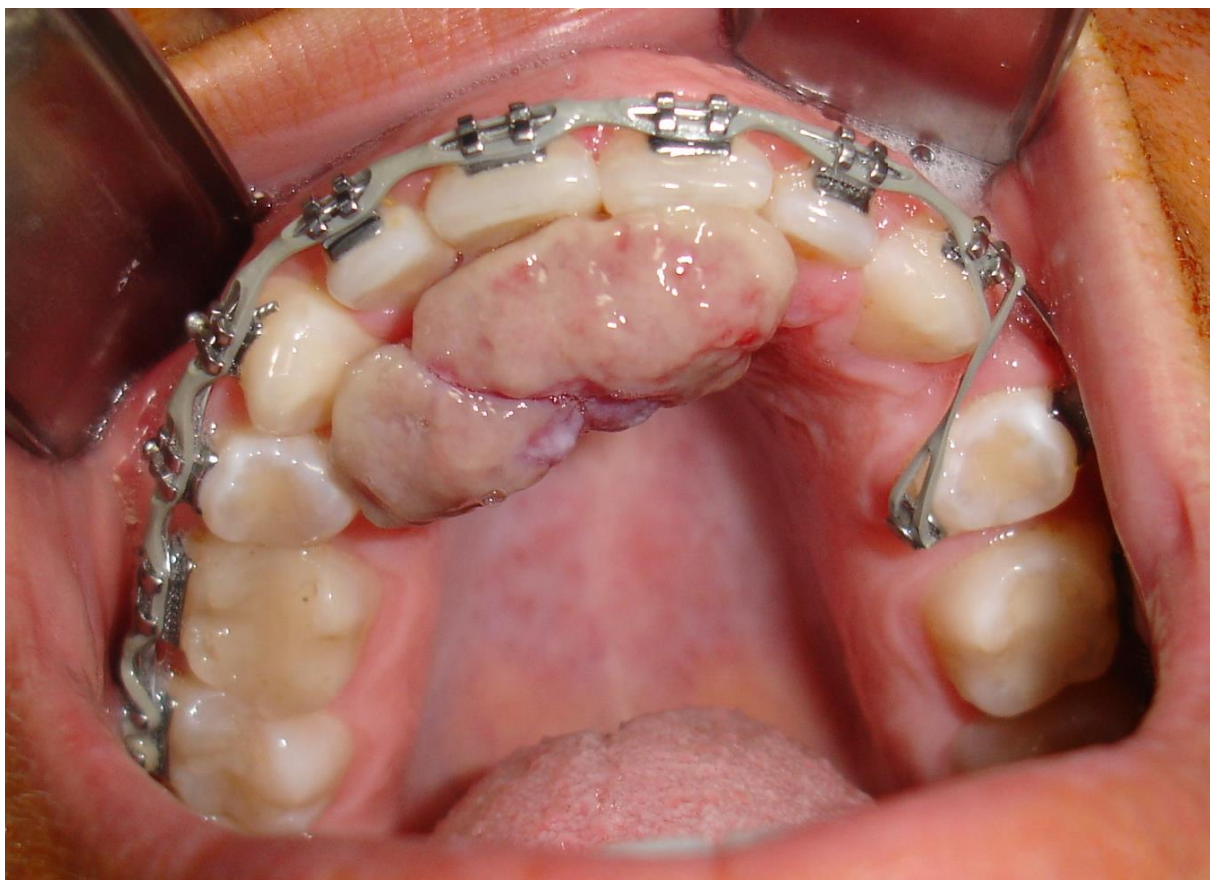
consistência macia e coloração roxa, evoluindo para textura emborrachada e coloração rósea na maturação (Figuras 1 e 2). Apresenta grande variedade de tamanho, mas raramente excede os 2,5 centímetros e geralmente cresce durante semanas ou meses e depois permanece do mesmo tamanho, apresentando, na maioria das vezes, desenvolvimento clínico lento, embora crescimento rápido também possa ser relatado (JAFARZADEH et al., 2006; GORDON-NUNEZ et al., 2010).

**Figura 1** - Granuloma piogênico em gengiva apresentando-se como um nódulo, de base pediculada, consistência flácida, coloração avermelhada e com ulceração superficial recoberta por pseudomembrana serofibrinosa.



Fonte: Da autora (2022).

**Figura 2** - Granuloma grávidico acometendo a mucosa palatina em paciente utilizando aparelho ortodôntico.



Fonte: Da autora (2022).

Deve ser realizado diagnóstico diferencial entre o GP, tumores vasculares e hemangiomas infantis, uma vez que o curso clínico pode variar de lesões benignas com autorresolução até lesões associadas com coagulopatias que podem colocar a vida do paciente em risco, porém, a superfície lobular do GP é a principal característica que ajuda na diferenciação dele para os demais tumores vasculares (JOHNSON et al., 2018).

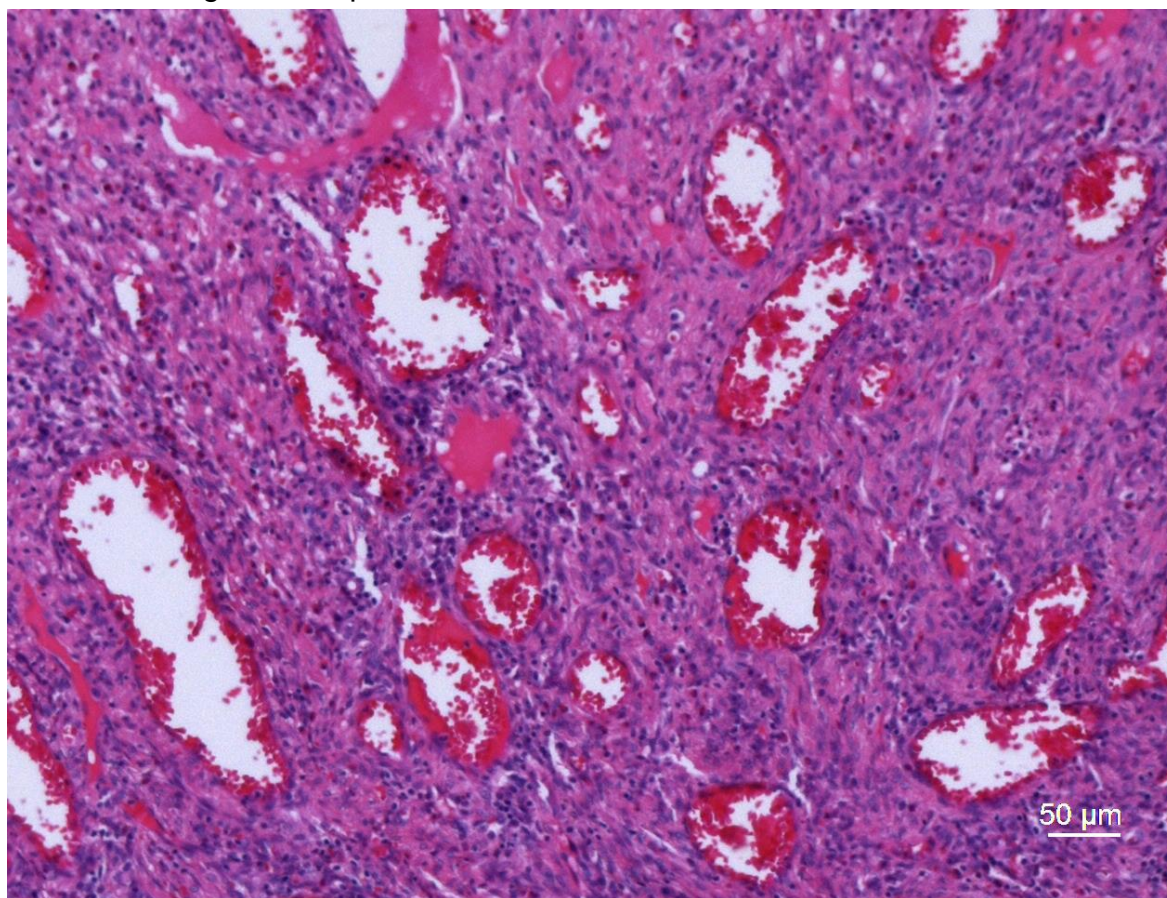
Microscopicamente, o GP é caracterizado por acentuada proliferação vascular em meio a tecido de granulação com infiltrado inflamatório, composto principalmente por linfócitos, podendo ser considerado como expressão exuberante de tecido de granulação em processos de cicatrização prolongados (Figura 3). Devido a sua capacidade angiogênica significativa, o GP pode ser classificado, de acordo com suas

características histológicas, em hemangioma capilar lobular, caracterizado pela proliferação de vasos sanguíneos dispostos em agregados lobulares que são separados por feixes de tecido conjuntivo, e hemangioma capilar não-lobular, que é caracterizado por intensa proliferação vascular, semelhante a tecido de granulação (BRAGADO et al., 1999; FREITAS et al., 2005; JAFARZADEH; SANATKHANI; MOHTASHAM, 2006; GONÇALES et al., 2010; SHARMA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2021).

Estudos têm demonstrado, também, que há diferença nas características histológicas de acordo com o estágio de evolução do GP na pele, as lesões mais jovens apresentam uma proliferação de tecido de granulação composta por numerosos capilares sanguíneos dispostos na superfície da lesão com um componente inflamatório composto principalmente por linfócitos e neutrófilos, por outro lado, as lesões mais maduras apresentam capilares sanguíneos bem desenvolvidos, com conformação lobular, separados por tecido conjuntivo de espessura variável e com menor quantidade de infiltrado inflamatório (BRAGADO et al., 1999).



**Figura 3** - Granuloma piogênico apresentando intensa proliferação vascular e vasos sanguíneos hiperêmicos.



Fonte: Da autora (2022).

Em relação ao tratamento, embora muitas modalidades sejam propostas, a excisão cirúrgica conservadora associada à remoção do agente irritante, é o tratamento de escolha, apresentando um índice de recidiva que varia de 0% a 16% (GONÇALES et al., 2010; GORDON-NUNEZ et al., 2010; MELINCOVICI et al., 2018). Porém, o tratamento adequado depende do diagnóstico definitivo, que deve ser feito com lesões como tecido de granulação convencional, hemangioma, fibroma traumático, hiperplasia fibrosa inflamatória, lesão periférica de células gigantes, fibroma ossificante periférico, mucocele e, mais raramente, com tumores malignos como carcinoma basocelular, sarcoma de Kaposi, angiossarcoma, linfoma não-Hodgkin, melanoma e carcinoma metastático, sendo o diagnóstico final dependente de biópsia e exame anatomopatológico (THOMPSON, 2017; CANIVELL-ZABALETA et al., 2018; MACNAMARA; KALMAR, 2019; SHARMA, et al., 2019).

A angiogênese é um processo extremamente complexo, caracterizada pela formação de novos vasos sanguíneos, sendo essencial para promover nutrientes, oxigênio e fatores de crescimento que sustentem a função celular, portanto, está relacionada ao crescimento normal, ao desenvolvimento e ao reparo tecidual, bem como com o crescimento tumoral e o desenvolvimento de metástases (BONHIN et al., 2015; MELINCOVICI et al., 2018; DU et al., 2020). Todo o processo de angiogênese conta com a participação de fatores inibidores e de fatores estimuladores do crescimento celular endotelial, cujo desequilíbrio contribui para o desenvolvimento de condições patológicas (DU et al., 2020; LU et al., 2018; MELINCOVICI et al., 2018; YUAN; JIN; LIN, 2000).

Um importante inibidor da angiogênese é o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), cujos mecanismos de sinalização são muito complexos, porém, um deles é a regulação através da angiopoietina-2 (Ang-2), que é responsável por desestabilizar as células endoteliais e promover a regressão vascular, em especial quando há diminuição da expressão de fatores angiogênicos. Já como fator estimulador da angiogênese, temos, por exemplo, a angiopoietina-1 (Ang-1) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A Ang-1, além dos efeitos pró-angiogênicos, promove a integridade do revestimento endotelial, em sinergia com o VEGF (YUAN; LIN, 2004; MEIJER-JORNA et al., 2012).

Devido a propriedades como a estimulação de migração e proliferação de células endoteliais, comprovada por testes angiogênicos *in vivo*, onde pode ser observado que a vasculogênese e a angiogênese estão prejudicadas em camundongos com mutação e que apresentam o VEGF não funcional, o VEGF é considerado um potente representante desses fatores, desempenhando papel tanto na angiogênese fisiológica, como o ciclo menstrual e a gestação, por exemplo, quanto na angiogênese patológica, induzindo o desenvolvimento e a progressão de condições como, por exemplo, crescimento de tumores e metástases, processos inflamatórios e retinopatia diabética.

O mais potente estimulador do VEGF é a hipóxia, através da indução da produção e recrutamento do fator induzido por hipóxia 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), outros fatores que regulam sua expressão são citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), o fator de crescimento transformante alfa e beta (TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ), o fator de crescimento

epidermal (EGF), as interleucinas e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF). Dessa forma, inúmeros trabalhos têm sido realizados com o objetivo de se utilizar o VEGF de forma mais eficiente como alvo ou agente terapêutico em doenças onde a angiogênese está alterada (DU et al., 2020; LU et al., 2018; MELINCOVICI et al., 2018; YUAN; JIN; LIN, 2000).

O VEGF é uma glicoproteína pró-inflamatória expressa no citoplasma e na membrana de vários tipos celulares, tanto em tecidos normais, como de tecidos alterados, tendo um importante papel em etapas críticas do processo angiogênico, incluindo a vasodilatação, a permeabilidade vascular, a desestabilização e degradação da matriz extracelular, a proliferação e migração das células endoteliais, a formação de lúmen e estabilização de vasos *in vitro* e *in vivo*. Além disso, pertence a uma família com vários membros que desempenham diferentes funções, sendo eles: VEGF-A, o mais importante regulador da angiogênese, VEGF-B, que contribui para a formação cardiovascular e a formação do miocárdio em estágios embrionários, VEGF-C, expresso em tecidos embrionários onde o desenvolvimento de vasos linfáticos é iniciado, VEGF-D, que apresenta propriedades semelhantes ao VEGF-C, VEGF-E, associado a um parapoxvírus, aumenta significativamente a permeabilidade vascular além de apresentar efeito mitogênico sobre as células endoteliais, VEGF-F, fator de crescimento da placenta (PIGF), que não desempenha papel importante na vasculogênese embrionária, mas atua na angiogênese patológica por sinergismo com o VEGF-A, e, mais recentemente, fator de crescimento vascular endotelial derivado da glândula endócrina, o EG-VEGF, localizado nas glândulas endócrinas produtoras de hormônios esteróides e nos tecidos placentários, onde está envolvido com a angiogênese patológica (DE FÁTIMA; DE CARVALHO PAPA, 2010; PIRES et al., 2016; LU et al., 2018; MELINCOVICI et al., 2018; DIKICI et al., 2020).

O VEGF-A, também chamado de VEGF, foi descrito pela primeira vez por Senger et al., em 1983, como fator de permeabilidade vascular (VPF). Desempenha um papel importante na vasculogênese e neoangiogênese, causando proliferação celular, apoptose, aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação e recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão. É secretado não apenas pelas células endoteliais, mas também, em resposta à privação de oxigênio, por células tumorais,



macrófagos, plaquetas, queratinócitos, células mesangiais dos rins, células T ativadas, leucócitos, células dendríticas, osteoblastos, células vasculares dos músculos lisos, dentre outras. Mais recentemente, descobriu-se que o VEGF é expresso nos miofibroblastos localizados no miocárdio, sugerindo sua implicação no reparo e remodelação tecidual pós-infarto (MELINCOVICI et al., 2018).

O VEGF se liga a receptores tirosina quinase com domínios extracelulares, transmembrana e intracelular, existindo três tipos de receptores, VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. O VEGFR-1 é expresso em células endoteliais mas, também, em outros tipos celulares como células inflamatórias, monócitos/macrófagos, células hematopoiéticas progenitoras derivadas da medula óssea e células tumorais, sendo que alguns estudos demonstraram que esse receptor apresenta um papel importante na diferenciação e migração de células endoteliais embrionárias, não possuindo papel importante em sua proliferação, concluindo, assim, que ele não está envolvido na vasculogênese embrionária. Em contrapartida, foi demonstrada sua participação na vasculogênese patológica, através de mecanismos como quimiotaxia de células inflamatórias, liberação de citocinas inflamatórias, recrutamento de células vasculares progenitoras, secreção de fatores de crescimento, interação com o PIGF e ativação de enzimas proteolíticas. O VEGFR-2 também é um receptor tirosina quinase expresso especialmente por células endoteliais de vasos sanguíneos e linfáticos, mas também podendo ser expresso por outros tipos celulares como células hematopoiéticas, megacariócitos, células progenitoras da retina, neurônios, osteoblastos e células tumorais. Estudos comprovaram que o VEGFR-2 está envolvido em angiogênese normal e patológica, tendo ação pró-angiogênica forte e estando frequentemente relacionado à angiogênese tumoral. Já o VEGFR-3, também é um receptor tirosina quinase, que apresenta importante papel na angiogênese de vasos linfáticos (LU et al., 2018; MELINCOVICI et al., 2018).

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que os hormônios esteroides femininos, estrogênio, progesterona e androgênio podem regular uma infinidade de condições na pele e mucosa, através de efeitos genômicos e não-genômicos. O beta-estradiol *in vitro* aprimora a transcrição do VEGF e, também, suprime a produção de trombospondina-1, uma citocina anti-angiogênica, além de estimular a migração, proliferação e ligação

das células endoteliais à laminina, colágenos I e IV, induzindo a formação de estruturas capilares, indicando que o beta-estradiol pode promover o desenvolvimento do GP, explicando uma maior incidência em gestantes e em mulheres em uso de contraceptivos orais (YUAN; LIN, 2004; KANDA; WATANABE, 2005).

Fenômenos angiogênicos, mediados por fatores como o VEGF, podem ser observados em uma série de fatores fisiológicos e patológicos na cavidade bucal, como, por exemplo, na inflamação, no reparo tecidual, no crescimento tumoral, nas metástases e em lesões como o hemangioma e o granuloma piogênico (FREITAS et al., 2005; RAVI et al., 1998).

Quando observamos a resposta fisiológica do organismo a danos tissulares de qualquer natureza, vimos que esses danos desencadeiam uma série de eventos que resultam da ativação de células nervosas, estromais, vasculares e circulatórias por estímulos físicos ou por sinalização química feitas por estruturas das células rompidas, fragmentos de elementos inertes no tecido, proteínas séricas que extravasam dos vasos rompidos e por ação de mediadores inflamatórios pré-formados e liberados por mastócitos, por exemplo. Na continuidade do processo de reparo, ocorre infiltração de células circulantes, como neutrófilos e monócitos, e migração de células das áreas adjacentes, como células epiteliais, queratinócitos e fibroblastos. Durante as fases do reparo tecidual, há intensa neovascularização, sendo o VEGF apontado como principal regulador da vasculogênese e angiogênese, pois é observado que os macrófagos e queratinócitos da região tem a expressão gênica de VEGF-A aumentada, além do aumento dos seus receptores nos vasos sanguíneos do tecido de granulação, hipótese reforçada pela demonstração de que a neutralização do VEGF por anticorpos reduz a angiogênese, a formação de tecido de granulação e o acúmulo de fluidos em regiões que sofreram lesão (HOWDIESHELL et al., 2001; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Da mesma forma, quando avaliamos a expressão do VEGF em tumores de cabeça e pescoço, incluindo o carcinoma de células escamosas de laringe, faringe e cavidade bucal, há relatos de um aumento da expressão do referido fator angiogênico nessas lesões, considerando o importante papel do VEGF na angiogênese tumoral e a relação dessa angiogênese com a formação, progressão e metástase tumoral, essa expressão aumentada pode estar relacionada a uma maior agressividade tumoral e um

pior prognóstico, porém, ainda não há consenso sobre a relação entre a expressão de VEGF e a presença de metástases a distância. Estudos com a finalidade de conhecer a relação do VEGF com o desenvolvimento tumoral são de extrema importância pois indicam terapias promissoras, como o uso de anticorpos monoclonais recombinantes anti-VEGF para tratamento do câncer de cabeça e pescoço (BONHIN et al., 2015).

Em hemangiomas orais, é possível observar o aumento da expressão de VEGF em todos os casos, sendo que essa expressão aumentada é observada principalmente no citoplasma de fibroblastos e nas células endoteliais de revestimento em proliferação nos microvasos presentes em lesões em fase proliferativa, enquanto o marcador não pode ser detectado em malformações vasculares nem em hemangiomas em fase involutiva, sendo, portanto, o hemangioma considerado como lesão proliferativa e não hamartomatosa, o que representa um importante achado, uma vez que tanto os hemangiomas, quanto as mal formações vasculares apresentam comportamento clínico distinto (TAKAHASHI et al., 1994; FREITAS et al, 2005).

Quando há a comparação entre a expressão do VEGF em hemangiomas orais e em GP, pode se observar uma diferença apenas no padrão de células que expressam o fator angiogênico com maior intensidade, sendo os macrófagos e fibroblastos no GP, e os fibroblastos, células endoteliais de revestimento e aglomerados de células endoteliais sem lúmen, não havendo outras diferenças significativas na neoformação vascular das duas lesões, o que apoia não apenas as semelhanças entre ambas as lesões, mas também uma tendência de que a angiogênese desempenha um papel importante na patogênese das duas lesões (TAKAHASHI et al., 1994; YUAN, et al., 2002; FREITAS, et al. 2005).

Estudos realizados para detectar a presença de VEGF no GP e, conseqüentemente, estudar sua participação na etiologia e desenvolvimento dessas lesões, observaram que a expressão de VEGF é significativamente maior no GP do que em regiões de gengiva saudável ou em regiões com periodontite instalada, sendo a maior parte do VEGF encontrada no citoplasma de macrófagos e fibroblastos, localizados ao redor dos capilares sanguíneos, indicando que essas células são a maior fonte de síntese e secreção do fator angiogênico. Outro achado importante desses estudos, foi o fato de não haver diferença significativa entre a expressão de

VEGF em tecidos colhidos em regiões de gengiva saudável e em regiões com periodontite, o que corrobora com a ideia de que o fator angiogênico tem importante papel na etiologia do GP (YUAN et al., 2000; FREITAS et al., 2005; ANDRIKOPOULOU et al., 2013).

Na avaliação da expressão de VEGF em GP de pele, observou-se que na pele clinicamente normal, não há expressão aumentada do fator, o que, mais uma vez, corrobora com a participação desse fator na patogênese do GP, além disso, o fator angiogênico foi expresso com maior intensidade em regiões onde havia proliferação de células endoteliais sem, portanto, haver a formação de lúmen, e foi expresso com menor intensidade em células endoteliais de capilares bem desenvolvidos, fenômeno que pode esclarecer a natureza autolimitante das lesões de GP, uma vez que vasos sanguíneos formados de maneira a permitir a formação completa de lúmen, permitem a circulação sanguínea e, conseqüentemente, o aumento do aporte de oxigênio na região, inibindo a expressão do VEGF. Esses achados também levam a potenciais terapêuticas alternativas no tratamento de GP recorrente, como a aplicação de tratamentos locais anti-VEGF ou o aumento do aporte de oxigênio local com a finalidade de diminuir a expressão do fator angiogênico (BRAGADO et al., 1999; MEIJER-JORNA et al., 2012). O fato de o VEGF ser expresso em maior quantidade pelos macrófagos e fibroblastos no GP pode ser explicado pela natureza hiperplásica da lesão e, portanto, pela conseqüente proliferação fibroblástica e pela presença de intenso infiltrado inflamatório rico em macrófagos (FREITAS et al., 2005).

No que se refere ao tumor gravídico, estudos têm demonstrado que a expressão do VEGF nessas lesões é maior que sua expressão no GP, sendo observada principalmente em macrófagos, sugerindo que os hormônios esteroides femininos desempenham papel adicional na potencialização do efeito angiogênico, aumentando a quantidade de VEGF produzido pelos monócitos e macrófagos, além de ter efeito protetor da apoptose nessas células. Além disso, outros estudos demonstram que fatores angiogênicos como o VEGF e o bFGF estão expressos em menores quantidades nessas lesões após o parto, em comparação com sua expressão durante a gravidez, levando à regressão espontânea da lesão, isso porque, após o parto, os hormônios esteroides femininos voltam aos níveis normais e as células produtoras de

VEGF perdem o efeito protetor fornecido por esses hormônios, ficando, portanto, sujeitas à ação de moléculas indutoras da apoptose (YUAN; LIN, 2004; FREITAS et al., 2005). Em contrapartida, há um aumento significativo da expressão de TNF- $\alpha$  após o parto, indicando que sua regulação ocorre dependente da diminuição dos hormônios esteroides femininos (YUAN; LIN, 2004).

Na busca de terapias não cirúrgicas para o GP, possíveis terapias anti-angiogênicas devem ser estudadas, em especial, duas moléculas devem ser investigadas mais profundamente, a angiostatina e a endostatina, uma vez que ambas são capazes de regular negativamente a expressão de VEGF, tanto *in vitro* como *in vivo*. A angiostatina é capaz de inibir a migração de monócitos e neutrófilos para a região da inflamação, agindo na regulação da angiogênese patológica, porém sem interferir na angiogênese fisiológica (YUAN; LIN, 2004).

Como o GP representa uma lesão cujo achado histológico mais significativo é a intensa proliferação vascular, sugerindo importante atividade angiogênica em seu desenvolvimento, o estudo de marcadores angiogênicos, em especial o VEGF, por seu envolvimento em todas as etapas da angiogênese, deve ser realizado na intenção de fornecer o diagnóstico, além do prognóstico e de outras informações sobre doenças vasculares. A importância deste estudo reside na tentativa de melhor entender a patogênese e o desenvolvimento do granuloma piogênico, bem como fornecer subsídios para, de forma eficiente e num futuro próximo, empregar o VEGF como alvo ou agente terapêutico.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a prevalência de granulomas piogênicos diagnosticados no Laboratório de Anatomopatologia Bucal da UNIFAL-MG no período de 1998 a 2020.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Analisar, através da imunohistoquímica, a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) nos granulomas piogênicos e comparar a imunoexpressão deste marcador com os aspectos clínicos e microscópicos apresentados por estas lesões.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Questões éticas**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Unifal-MG, CAAE 40303820.8.0000.5142 (APÊNDICE 1).

### **4.2 Casuística e seleção da amostra**

Foi realizado um levantamento de todos os casos de granulomas piogênicos bucais diagnosticados e arquivados no Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), no período de 1998 a 2020. Foram coletados, das fichas de solicitações de exames enviadas pelos profissionais ao laboratório, os dados demográficos dos pacientes, como: idade, gênero, cor da pele e, em caso de pacientes do gênero feminino, se gestante, não gestante ou não informado. A localização da lesão, o aspecto clínico e o respectivo diagnóstico clínico sugerido pelo profissional, o diagnóstico microscópico definitivo, bem como o número do laudo anatomopatológico também foram registrados (APÊNDICE 2).

### **4.3 Análise microscópica qualitativa**

Para a análise microscópica, foram utilizados cortes microscópicos de cinco micrometros ( $\mu\text{m}$ ) de espessura, corados em Hematoxilina e Eosina (HE) e montados em lâminas arquivadas no Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Unifal-MG, oriundos de fragmentos de biópsias enviadas ao referido laboratório com finalidade diagnóstica.

A análise morfológica das lesões foi realizada individualmente por dois examinadores, utilizando-se um microscópio óptico binocular (AxioLab- Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) contendo uma lente objetiva N-Achroplan de 40X/0,65, resultando num aumento final de 400X. Foram incluídos no estudo apenas os casos em que se observava uma proliferação vascular exuberante, característica de GP. Casos

sem lâminas ou blocos disponíveis, ou com quantidade de tecido remanescente insuficiente para novo processamento histológico foram excluídos do estudo. As lesões foram também classificadas como granulomas piogênicos e granulomas gravídicos e as características microscópicas avaliadas foram o epitélio, que foi classificado como ausente, atrófico, normal e hiperplásico; além da presença ou ausência de ulceração.

#### 4.4 Reação imunoistoquímica

Foram confeccionados cortes de três micrometros ( $\mu\text{m}$ ) de espessura e colocados em lâminas silanizadas para a reação imunoistoquímica, seguindo-se os protocolos do ANATOMED Instituto de Anatomia Patológica de Bauru-SP.

Os cortes microscópicos foram desparafinados em Xilol realizando-se duas trocas de cinco minutos cada. Em seguida foram hidratados em álcoois em concentrações decrescentes: absoluto; 90%; 70%; 50%; até água corrente e, posteriormente, lavados em água corrente por cinco minutos.

Na próxima etapa, foram colocados 420 mililitros de água destilada na câmara de recuperação da Panela Pascal, a uma temperatura de  $118^{\circ}\text{C}$ , por dois minutos. Aguardou-se chegar à temperatura de  $90^{\circ}\text{C}$  por 10 segundos e retirou-se a pressão restante. Em seguida, abriu-se a tampa da panela e colocou-se a cuba com as lâminas em temperatura ambiente por 20 minutos. Os cortes foram, posteriormente, lavados e mantidos em água destilada até o passo seguinte.

A peroxidase endógena foi inativada utilizando-se o peróxido de hidrogênio a 3% em PBS, por dez minutos, e após este tempo os cortes foram lavados com água destilada. O anticorpo primário VEGF (M7273, clone VG1; Dako, Carpinteria, CA, EUA; diluição 1:150) foi aplicado e os cortes acondicionados em uma câmara umidificada numa geladeira, na temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , e deixadas *overnight*. Depois da incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas com PBS. Após a lavagem, foi aplicado o polímero de ligação (EnVision Flex HRP, Dako, Carpinteria, CA, EUA) e deixado por 40 minutos em temperatura ambiente. Após o tempo de ação do EnVision Flex HRP, as lâminas foram novamente lavadas com PBS, o excesso foi aspirado e aplicado diaminobenzidina (Dako, Glostrup, Dinamarca) como cromogênio por 10



minutos em temperatura ambiente. A contracoloração foi realizada com a Hematoxilina de Harris diluída por dois minutos.

Controles positivo e negativo, através da omissão do anticorpo primário, foram usados em todas as reações. Foram incluídos para comparação cortes de placenta humana.

#### **4.5 Análise da imunexpressão de VEGF**

A análise da imunexpressão do VEGF em granulomas piogênicos foi realizada utilizando-se o software de captura de imagens (AxioVision Rel. 4.8.2- Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) instalado em um microcomputador. Para a aquisição das imagens, utilizou-se uma câmera fotográfica digital (AxioCamMRc 1.4 Mb- Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico binocular (AxioLabCarl Zeiss, Göttingen, Alemanha) contendo uma lente objetiva N-Achroplan de 40X/0,65; resultando num aumento final de 400X.

A análise imunistoquímica semiquantitativa foi feita de acordo com Klein et al. (1999) através da determinação de escores. Inicialmente, analisou-se a porcentagem de células marcadas, a saber:

- Escore 0: ausência de marcação;
- Escore 1: até 30% das células marcadas;
- Escore 2: entre 30 e 60% das células marcadas;
- Escore 3: Mais de 60% das células marcadas.

Em seguida, avaliou-se a intensidade da marcação, representada por:

- Escore 0: ausência de marcação;
- Escore 1: marcação fraca;
- Escore 2: marcação moderada;
- Escore 3: marcação forte.

Para a determinação dos Escores Finais de marcação, multiplicou-se o escore da porcentagem de células marcadas pela intensidade da marcação, cujos valores variou de 0 a 9. Esta análise foi realizada por dois examinadores independentes, como proposto por Klein et al. (2001).

#### **4.6 Análise estatística**

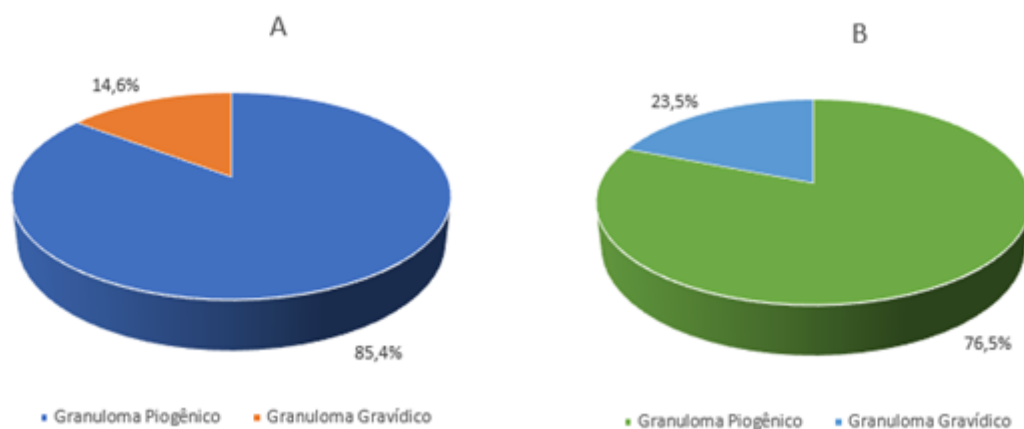
Os registros das informações demográficas dos pacientes portadores de granulomas piogênicos e os parâmetros microscópicos foram armazenados em um banco de dados, elaborado em planilha eletrônica do Microsoft Excel. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico para microcomputador SPSS for Windows, versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Foram utilizados os testes de Qui-quadrado e o teste exato de Fischer, sendo que diferenças com  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

## 5 RESULTADOS

De um total de 10.667 laudos anatomopatológicos emitidos, no período de janeiro de 1998 até dezembro de 2020, no Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Unifal-MG, foram diagnosticados 191 (1,8%) casos de granuloma piogênico bucal.

Os granulomas piogênicos acometeram com maior frequência o gênero feminino (119 casos- 62,3%), sendo que 28 desses casos acometeram gestantes, o que representa uma prevalência de 23,5% do granuloma gravídico, quando comparado com o número total de casos em mulheres e de 14,6% no total de casos (Gráfico 1). Apenas 37,7% (72) dos casos foi diagnosticado em homens. De todos os casos diagnosticados, 22 (11,5%) representavam recidivas.

**Gráfico 1** - Prevalência de granulomas gravídicos nos casos diagnosticados em ambos os gêneros (A) e nos casos diagnosticados apenas no gênero feminino (B).

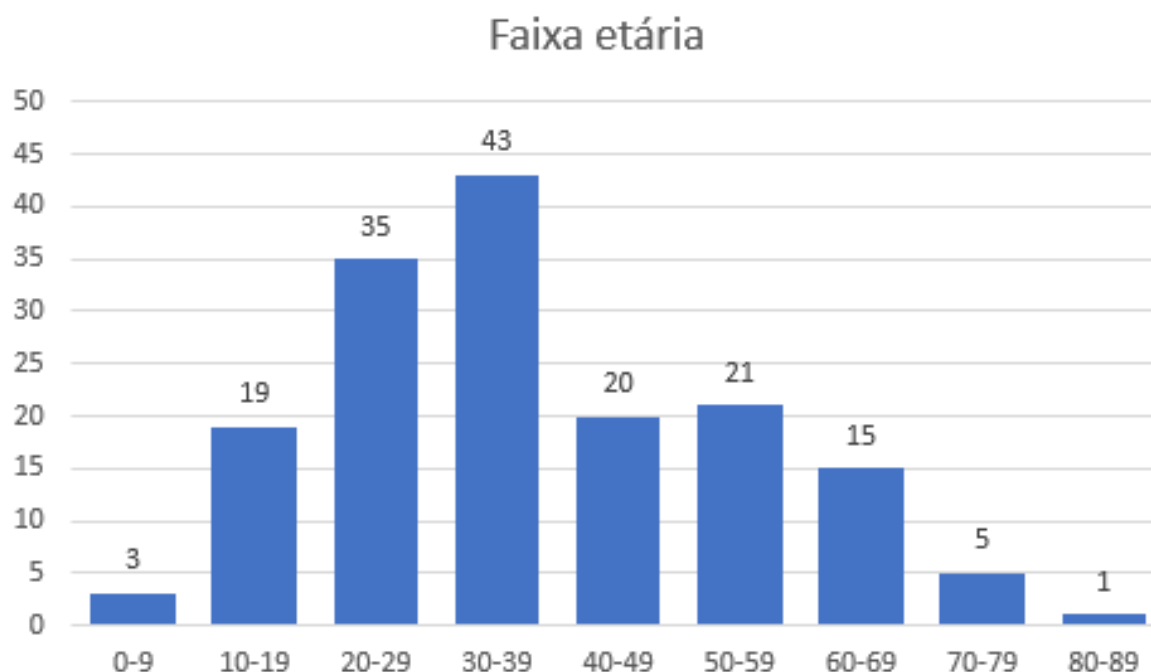


Fonte: Da autora (2022).

Em relação à cor da pele dos pacientes, 111 (58,1%) eram leucodermas, 11 (5,7%) eram feodermas e 24 (12,6%) eram melanodermas. A cor da pele não foi descrita pelos profissionais que realizaram a biópsia em 45 (23,6%) pacientes.

A idade dos pacientes diagnosticados com granuloma piogênico variou de 4 a 87 anos, com uma idade média de 37,85 anos. O maior número de casos foi diagnosticado na terceira (35 – 18,4%) e quarta (42- 22%) décadas de vida, conforme descrito no Gráfico 2. Cento e cinco (55%) pacientes apresentavam-se com 30 anos ou mais no momento do diagnóstico. Apenas 57 (29,8%) casos foram diagnosticados em pacientes com menos de 30 anos e em 29 (15,2%) fichas não foram relatadas as idades dos pacientes.

**Gráfico 2** - Distribuição do número de casos de granuloma piogênico por décadas de vida quando do diagnóstico.



Fonte: Da autora (2022).

Em relação à localização, 119 (62,3%) casos estavam presentes em sítios gengivais e 57 (29,9%) em sítios extra-gengivais. Dos casos localizados em sítios gengivais, 38 (19,9%) estavam na gengiva anterior superior, 28 (14,6%) na gengiva posterior superior, 21 (11,1%) na gengiva anterior inferior e 32 (16,7%) na gengiva posterior inferior. Dos sítios extra-gengivais descritos nos laudos, o mais acometido foi a língua, com 29 (15,2%) casos, seguida do lábio inferior, com 13 (6,8%) casos e da mucosa jugal com 9 (4,7%) casos. Outros sítios relatados foram o lábio superior, com 3 (1,6%) casos, o palato mole com 2 (1,1%) casos e o palato duro com 1 (0,5%) caso. Em 15 (7,8%) laudos não havia descrição da localização da lesão (Tabela 1).

**Tabela 1** - Distribuição dos casos de granuloma piogênico segundo a localização no momento do diagnóstico

Localizações	Total (n=191)
Sítios gengivais	<b>119 (62,3%)</b>
Gengiva anterior superior	38 (19,9%)
Gengiva posterior superior	28 (14,6%)
Gengiva anterior inferior	21 (11,1%)
Gengiva posterior inferior	32 (16,7%)
Sítios extra-gengivais	<b>57 (29,9%)</b>
Língua	29 (15,2%)
Lábio inferior	13 (6,8%)
Mucosa jugal	9 (4,7%)
Lábio superior	3 (1,6%)
Palato mole	2 (1,1%)
Palato duro	1 (0,5%)
<b>Local não informado</b>	<b>15 (7,8%)</b>

Fonte: Da autora (2022).

Em nossa casuística, a apresentação clínica mais frequentemente relatada pelos profissionais quando da descrição das lesões foi de nódulo pediculado, 84 (44,0%) casos, ou séssil, 50 (26,2%) casos. As demais apresentações clínicas descritas foram nódulo (5,3%) ou úlcera (0,5%). Em 46 (24,0%) casos não foram descritas as apresentações clínicas.

Foram analisados também os diagnósticos clínicos sugeridos pelos profissionais e registrados nas fichas de biópsias enviadas ao laboratório. Em 126 (65,9%) casos, os profissionais indicaram apenas um diagnóstico clínico. Dois diagnósticos clínicos foram sugeridos em 43 (22,5%) casos, e, em apenas dez (5,2%) casos, foram sugeridos três diagnósticos clínicos. A hipótese mais citada foi de GP (63,87%), seguida de hiperplasia fibrosa inflamatória (23,56%), de lesão periférica de células gigantes (8,37%) e de fibroma (4,18%). Outros diagnósticos diferenciais foram carcinoma espinocelular (2,61%), papiloma escamoso (2,61%), fibroma ossificante periférico (1,57%), sarcoma (0,52%) e lesão vascular (0,52%). Em 12 (6,4%) casos, os profissionais que realizaram a biópsia não sugeriram diagnóstico clínico.

Quando avaliados os tamanhos das lesões no momento do diagnóstico, segundo o que foi descrito pelo profissional que realizou a biópsia nas fichas clínicas, 91 (47,7%) casos tinham até um centímetro em seu maior diâmetro, 25 (13,1%) tinham entre um e dois centímetros, quatro (2,1%) entre dois e quatro centímetros e apenas dois (1,0%) tinham mais de quatro centímetros. Em 70 (36,1%) casos não havia descrição do tamanho nas fichas clínicas.

A análise microscópica iniciou-se pela revisão dos diagnósticos microscópicos e avaliação do epitélio, sendo que a grande maioria dos casos, 164 (85,9%), apresentavam apenas epitélio hiperplásico, cinco (2,7%) casos apresentavam ausência de epitélio, três (1,6%) apenas epitélio normal e um (0,5%) caso apenas com epitélio atrófico. Das lâminas analisadas, 18 (9,4%) casos apresentavam áreas com tipos diferentes de epitélio, sendo que cinco (2,7%) deles apresentavam regiões com epitélio normal, atrófico e hiperplásico, sete (3,7%) apresentavam regiões com epitélio atrófico e hiperplásico, dois (1,0%) casos com regiões de epitélio normal e atrófico e quatro (2,1%) com regiões de epitélio normal e hiperplásico. Durante a análise microscópica,

também foi avaliada a presença de ulceração, sendo que em 159 (83,3%) casos a ulceração estava presente e nos 39 (16,7%) restantes não.

Ao se correlacionar os dados demográficos dos pacientes (idade e cor) e as características clínicas das lesões (aspecto clínico, localização, tamanho e presença de recidiva) com os diagnósticos de granuloma piogênico (convencional) e de granuloma gravídico, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Isso foi observado quando se comparou a presença de ulceração com os diagnósticos de granulomas piogênico (convencional) e gravídico (Tabela 2).

**Tabela 2** - Distribuição das frequências, idade, recidiva, tamanho e ulceração, após a realização do teste exato de Fisher (\*) e os dados de cor, localização e aspecto clínico após a realização do Teste Qui-quadrado (\*\*).

	Granulomas piogênicos		<i>p</i> valor
	Convencional n(%)	Gravídico n(%)	
Idade			<i>p</i> = 0,538*
≤ 18 anos	18 (13,3%)	2 (7,4%)	
> 18 anos	117 (86,7%)	25 (92,6%)	
Cor			<i>p</i> = 0,69**
Leucoderma	92 (75,4%)	19 (79,2%)	
Outras	30 (24,6%)	5 (20,8%)	
Recidiva			<i>p</i> = 0,538*
Sim	18 (11%)	4 (14,3%)	
Não	145 (89%)	24 (85,7%)	
Localização			<i>p</i> = 0,648**
Gengival	99 (64,7%)	16 (69,6%)	
Extra-gengival	54 (35,3%)	7 (30,4%)	
Tamanho			<i>p</i> = 1,0*
≤ 2 cm	77 (74,8%)	14 (73,7%)	
> 2 cm	26 (26,2%)	5 (26,3%)	
Aspecto clínico			<i>p</i> = 0,292**
Nódulo séssil	54 (45%)	8 (33,3%)	
Nódulo pediculado	66 (55%)	16 (66,7%)	
Ulceração			<i>p</i> = 0,79*
Não	27 (16,6%)	5 (17,9%)	
Sim	136 (83,4%)	23 (82,1%)	

Fonte: Da autora (2022).



Quando se correlacionou as localizações das lesões (gingivais e extra-gingivais) com os demais dados demográficos dos pacientes, as características clínicas das lesões e a presença ou não de ulceração; houve diferença estatisticamente significativa apenas em relação ao tamanho das lesões. Os granulomas piogênicos, independente das localizações, apresentavam-se predominantemente com um tamanho menor que dois centímetros no momento do diagnóstico. Entretanto, as lesões em sítios extra-gingivais possuíam em sua grande maioria menos de dois centímetros (Tabela 3).

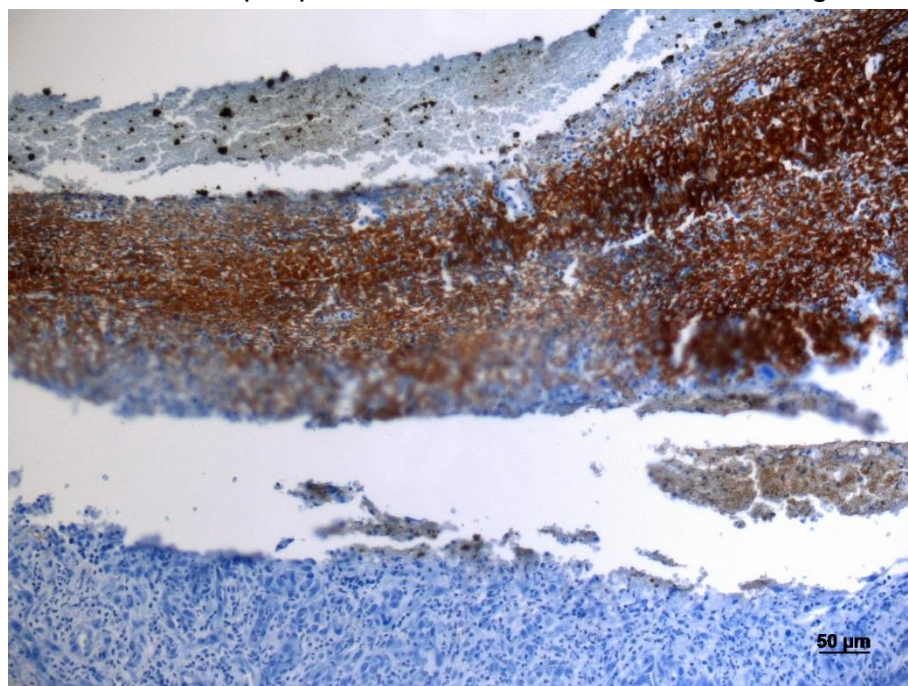
Em relação à análise imunohistoquímica, não foi possível realizá-la de forma quantitativa, como proposto na metodologia, pois as marcações dos anticorpos se concentraram nas áreas de ulcerações recobertas por pseudomembrana serofibrinosa (Figura 4). Além disso, verificou-se também em alguns casos a presença de marcação em células dispersas por áreas representadas por coágulos sanguíneos (Figura 5). Marcações não foram observadas nas áreas de proliferação vascular, com algumas raras exceções, nem em tecido epitelial (Figuras 6 e 7).

**Tabela 3** - Distribuição das frequências, idade, gênero, recidiva, cor, tamanho, aspecto clínico e ulceração, após a realização do Teste Qui-quadrado.

	Localizações		p valor
	Gengival n(%)	Extra-gengival n(%)	
<b>Idade</b>			<i>p</i> = 0,375
≤ 18 anos	15 (14,4%)	4 (9,1%)	
> 18 anos	89 (85,6%)	40 (90,9%)	
<b>Gênero</b>			<i>p</i> = 0,641
Feminino	43 (37,4%)	25 (41%)	
Masculino	72 (62,6%)	36 (59%)	
<b>Recidiva</b>			<i>p</i> = 0,209
Sim	17 (14,8%)	5 (8,2%)	
Não	98 (85,2%)	56 (91,2%)	
<b>Cor</b>			<i>p</i> = 0,530
Leucoderma	64 (75,3%)	40 (80%)	
Outras	21 (24,7%)	10 (20%)	
<b>Tamanho</b>			<i>p</i> = 0,028
≤ 2 cm	44 (65,7%)	38 (84,4%)	
> 2 cm	23 (34,3%)	7 (15,6%)	
<b>Aspecto clínico</b>			<i>p</i> = 0,306
Nódulo séssil	40 (47,1%)	19 (38%)	
Nodulo pediculado	45 (52,9%)	31 (62%)	
<b>Ulceração</b>			<i>p</i> = 0,064
Não	24 (20,9%)	6 (9,8%)	
Sim	91 (79,1%)	55 (90,2%)	

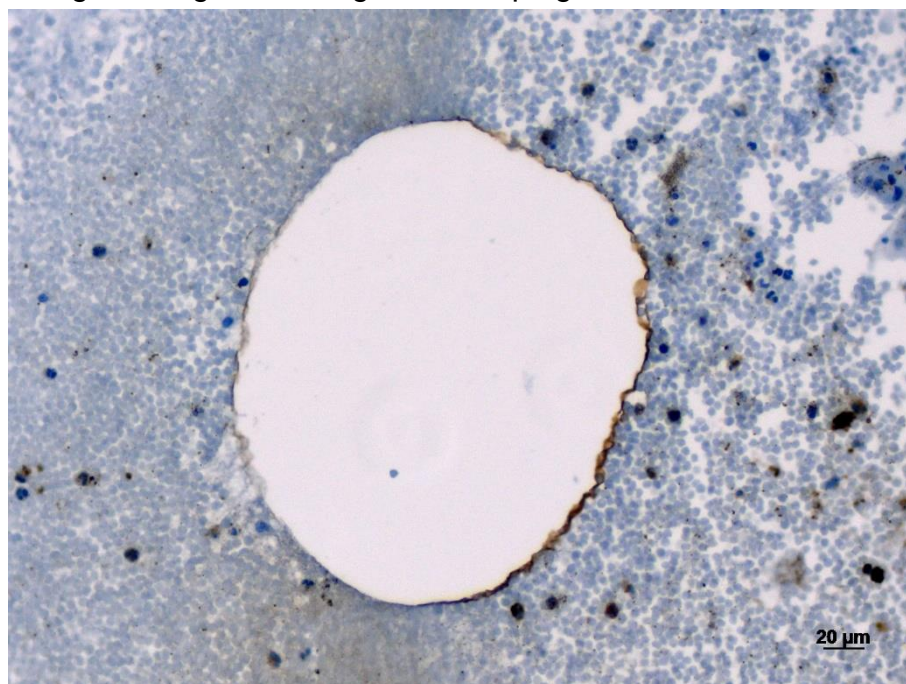
Fonte: Da autora (2022).

**Figura 4** - Imunoexpressão intensa do anticorpo VEGF em área de ulceração recoberta por pseudomembrana serofibrinosa em granuloma piogênico.



Fonte: Da autora (2022).

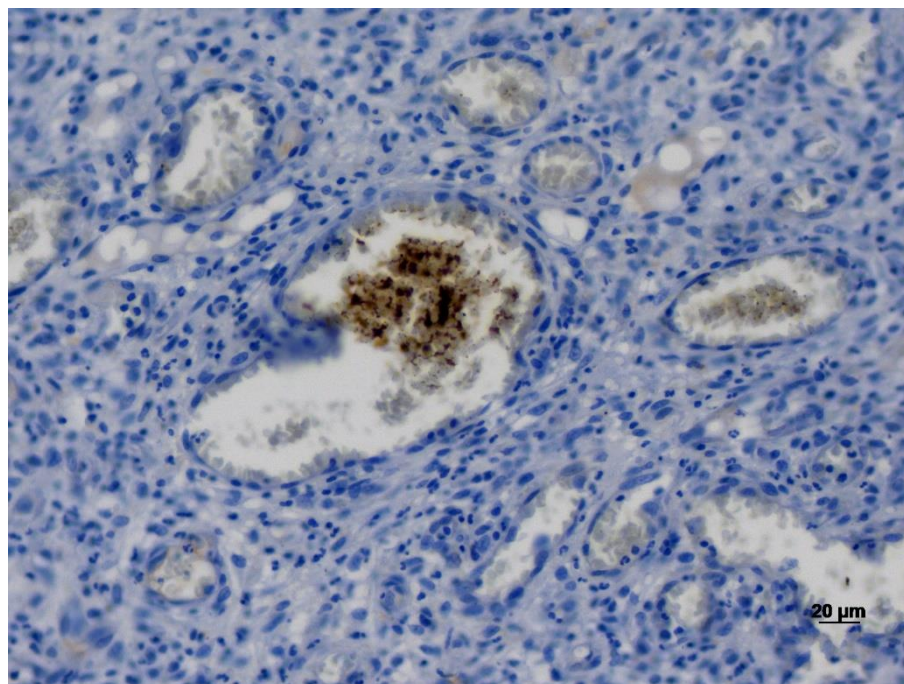
**Figura 5** - Imunoexpressão do anticorpo VEGF em células dispersas em área de coágulo sanguíneo em granuloma piogênico.



Fonte: Da autora (2022).

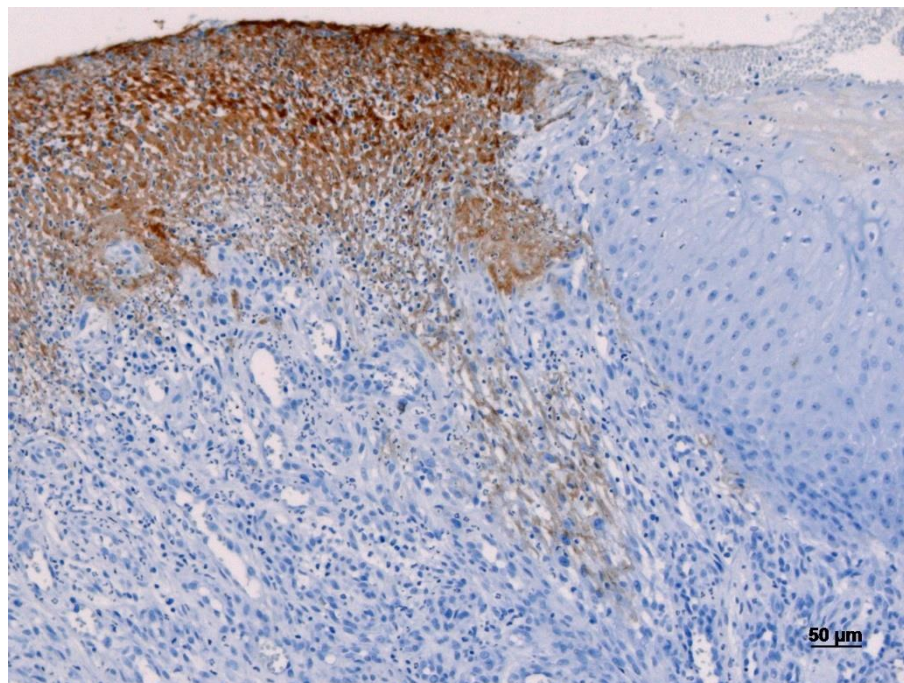


**Figura 6** - Ausência de imunomarcção do anticorpo VEGF em vasos sanguíneos do granuloma piogênico. Nota-se apenas uma marcação positiva no plasma intravascular.



Fonte: Da autora (2022).

**Figura 7** - Ausência de imunomarcção do anticorpo VEGF no epitélio e intensa imunopositividade na área de ulceração do granuloma piogênico.



Fonte: Da autora (2022).

## 6 DISCUSSÃO

Lesões de natureza proliferativa não neoplásicas são bastante comuns, sendo o granuloma piogênico um importante representante desse grupo devido a sua alta prevalência, podendo acometer tanto a pele como a mucosa bucal (JAFARZADEH; SANATKHANI; MOHTASHAM, 2006; SARAVANA, 2009; KAMAL et al., 2012). Embora sua patogênese não seja bem esclarecida, é considerado de natureza reativa, uma vez que seu crescimento se dá em resposta a estímulos como a irritação crônica de baixa intensidade e fatores hormonais, sendo considerado uma resposta exagerada dos tecidos a esses estímulos (SHARMA et al., 2019; MAYMONE et al., 2019).

Alguns estudos demonstram que cerca de 1,85% das biópsias realizadas na cavidade bucal confirmam o diagnóstico de granuloma piogênico, enquanto outros estudos consideram uma prevalência ainda maior, entre 3,51% a 7% (KAMAL et al., 2012; GORDON-NUNEZ et al., 2010). Em nosso estudo, verificou-se uma prevalência de 1,8% (191) dentre os 10.667 laudos anatomopatológicos emitidos no Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Unifal-MG, de janeiro de 1998 até dezembro de 2020.

Foi observada uma predominância em pacientes leucodermas, que representaram 58,1% da nossa casuística, o que também foi verificado em um estudo realizado por Gordon-Nunez et al. (2010), podendo estar relacionado ao fato de que, por fatores socioeconômicos, esse grupo tem acesso mais facilitado aos serviços de saúde bucal no Brasil.

Com relação à localização, o GP tem predileção pela região de cabeça e pescoço (62,4%) sendo que as lesões intra-bucais representam cerca de 24% de todos os casos diagnosticados (GIBLIN et al., 2007; SARAVANA, 2009). Dentro da cavidade bucal, os sítios gengivais são a localização mais comum, seguida de lábio, língua, mucosa jugal e palato (AL-KHATEEB; ABABNEH, 2003; SARAVANA, 2009; GORDON-NUNEZ et al., 2010; PARK et al., 2017; RIBEIRO et al., 2021). Quando se analisou as localizações das lesões em nosso estudo, observou-se uma predileção para gengiva (62,3%). Dentre as localizações extra-gengivais, língua, lábios, mucosa jugal e palatos mole e duro foram os locais mais acometidos.

A idade do paciente no momento do diagnóstico da lesão é um parâmetro clínico importante para a formulação do diagnóstico diferencial (RIBEIRO et al., 2021). Em nossa casuística, houve uma maior ocorrência do GP nas terceira e quarta décadas de vida, com a grande maioria dos pacientes apresentando entre 20 e 40 anos de idade no momento do diagnóstico, como relatado por alguns autores (KANDA; WATANABE, 2005; MAYMONE et al., 2019; SHARMA et al., 2019). Vale destacar que granulomas piogênicos presentes em crianças podem apresentar um crescimento rápido, podendo ser confundido com uma neoplasia maligna. Sendo assim, o profissional deve se atentar para este fato e incluir dentre as hipóteses diagnósticas o granuloma piogênico.

Quando se analisa o gênero dos pacientes portadores de GP, frequentemente se observa um predomínio de pacientes do gênero feminino numa proporção de 1,5:1 (AL-KHATEEB; ABABNEH, 2003; KANDA; WATANABE, 2005; CANIVELL-ZABALETA et al., 2018; MAYMONE et al., 2019; SHARMA et al., 2019). Pudemos observar em nossos achados uma proporção semelhante, de 1,6:1. Essa predileção provavelmente se deve aos efeitos dos hormônios esteroides femininos, como a progesterona e o estrógeno, que regulam o aparecimento e desenvolvimento de inúmeras condições biológicas e imunológicas (KANDA; WATANABE, 2005; TRENTO et al., 2014; CANIVELL-ZABALETA et al., 2018). Esses efeitos podem ser explicados por mecanismos genômicos, relacionados a regulação negativa da expressão gênica de receptores, e não genômicos, relacionados a regulação negativa ou positiva da expressão de receptores após a interação desses hormônios com receptores da superfície celular, o que leva a uma cascata de eventos intra-celulares (KANDA; WATANABE, 2005).

Clinicamente, o GP se apresenta como uma lesão exofítica, podendo ser caracterizada como nódulo ou pápula, séssil ou pediculada, que sangra facilmente ao toque, com superfície lisa ou lobulada, podendo estar recoberto por pseudomembrana serofibrinosa, e com tamanho que varia de poucos milímetros a alguns centímetros, raramente excedendo 2,5 centímetros (JAFARZADEH; SANATKHANI; MOHTASHAM, 2006; MAYMONE et al., 2019). Em nossa casuística, mais da metade das lesões (60,8%) foram descritas pelos profissionais que realizaram a biópsia como tendo até 2

centímetros em seu maior diâmetro, sendo o nódulo pediculado a apresentação clínica mais relatada pelos profissionais.

Muitos fatores podem influenciar a formulação de hipóteses diagnósticas, quando da presença de uma lesão em cavidade bucal, desde a experiência do profissional responsável até os aspectos clínicos da lesão. Diante de lesões sugestivas de GP, os principais diagnósticos diferenciais encontrados na literatura são a hiperplasia fibrosa inflamatória, o fibroma traumático e a lesão periférica de células gigantes, além de lesões como o hemangioma, o fibroma ossificante periférico, o angiossarcoma, o linfoma não-Hodgkin e o sarcoma de Kaposi (SHARMA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2021). Em nossa casuística, os diagnósticos clínicos mais frequentemente sugeridos pelos profissionais que realizaram as biópsias foram, em sua grande maioria, de lesões benignas, sendo o granuloma piogênico, a hiperplasia fibrosa inflamatória e a lesão periférica de células gigantes os mais sugeridos.

Para o estabelecimento do diagnóstico final de granuloma piogênico, devem ser levados em conta os aspectos clínicos e, principalmente, a análise microscópica. De modo geral, a história natural do granuloma piogênico segue três fases distintas. Na fase celular, os lóbulos são compactos e celulares com a formação de poucos lúmens. Na fase capilar, os lóbulos tornam-se francamente vasculares e preenchidos por hemácias abundantes. Na fase involutiva, há uma tendência para o desenvolvimento de fibrose intra e perilobular com diferenciação venular aumentada (JAFARZADEH; SANATKHANI; MOHTASHAM, 2006). Embora algumas técnicas de tratamento tenham sido descritas para o GP, como criocirurgia e cirurgia a laser, a excisão cirúrgica local conservadora seguida da remoção do agente causador compreende o procedimento mais utilizado e eficaz, apresentando uma taxa de recidiva que varia de 3% a 23% (GORDON-NUNEZ et al., 2010; SHARMA et al., 2019). Nós verificamos uma taxa de recidiva de 11% nos casos incluídos em nosso estudo. Al-Khateeb; Ababneh (2003), avaliando 108 casos de granulomas piogênicos bucais, encontraram uma taxa de recidiva de 5,8%. No estudo realizado por Gordon-Nunez et al. (2010), a taxa de recidiva foi de 8,2% nos 293 casos de GP bucais estudados.

O GP é caracterizado microscopicamente pela intensa proliferação vascular, semelhante ao tecido de granulação, em meio a tecido de granulação com infiltrado

inflamatório misto, composto principalmente por neutrófilos, plasmócitos e linfócitos. A superfície é geralmente ulcerada e recoberta por pseudomembrana serofibrinosa. Quando o epitélio está presente, este pode ser hiperplásico, normal ou atrófico (FREITAS et al., 2005; GONÇALES et al., 2010; SHARMA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2021). A análise microscópica da nossa amostra evidenciou que a grande maioria dos casos estudados (83,3%) apresentava a superfície ulcerada, resultados semelhantes podem ser verificados em outros estudos (SHARMA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2021).

Células inflamatórias como os mastócitos e os eosinófilos estão envolvidas na angiogênese e nos processos de reparo dos tecidos, através da liberação de mediadores que aumentam a permeabilidade vascular e a vasodilação, além de facilitarem a migração de outras células inflamatórias, promovendo a formação de tecido de granulação, que é a principal característica do GP (RIBEIRO et al., 2021). Granulomas piogênicos podem promover a angiogênese pela liberação de fatores angiogênicos. Dentre estes fatores, destaca-se o VEGF como um potente estimulador da proliferação de células endoteliais, sendo um potencial mediador da angiogênese em GP. O VEGF é normalmente secretado por diferentes tipos celulares não-endoteliais, como células musculares lisas e neoplásicas. Em condições de normalidade, células endoteliais não produzem VEGF; entretanto, uma forte expressão de VEGF pode ser obtida quando as células endoteliais são submetidas a hipóxia ou estresse oxidativo (BRAGADO et al., 1999).

Yuan; Jin; Lin (2000) afirmaram que a patogênese do GP a nível molecular pode ser considerada como o desequilíbrio entre os fatores estimuladores e inibidores da angiogênese. Para estes autores, a super-expressão de VEGF e bFGF e a diminuição da quantidade de angiostatina podem levar a formação do granuloma piogênico bucal; mas a relação entre estes níveis é desconhecida. Além disso, há uma provável relação entre a ação dos hormônios esteroides na etiologia do GP. Em outro estudo, estes mesmos autores concluíram que os hormônios esteroides femininos não apenas aumentam a quantidade de fatores angiogênicos dos monócitos/macrófagos ativados, mas também protegem os macrófagos da apoptose prolongando, conseqüentemente, o efeito angiogênico. A combinação destes efeitos pode auxiliar o tecido inflamado a ultrapassar o limiar de uma gengivite crônica para a formação de um granuloma



piogênico (YUAN; JIN; LIN, 2002). Tais afirmações podem justificar o aparecimento de granulomas gravídicos e a regressão espontânea destas lesões após o parto, quando os níveis de hormônios esteroides se normalizam.

Segundo Becker, Domschke; Pohle (2004), o estudo do VEGF é de extrema importância pois ele é o principal alvo molecular para a angiogênese terapêutica, uma vez que está envolvido no processo de cicatrização através da estimulação de fibroblastos, células inflamatórias e endoteliais. Os mesmos autores verificaram que a associação do VEGF à fibrina promove uma resposta proliferativa endotelial. Durante o processo de reparo de feridas há a formação de fibrina, que é responsável pela ativação de respostas celulares, estimulando a proliferação e adesão das células endoteliais; participando, assim, ativamente da angiogênese. A fibrina é componente de muitos tumores e se deposita como resultado do aumento da permeabilidade vascular. O VEGF aumenta a permeabilidade vascular o que leva à formação de fibrina e a proliferação de células endoteliais necessárias à angiogênese (SAHNI; FRANCIS, 2000). A ligação do VEGF à fibrina e ao fibrinogênio foi comprovada em um estudo realizado por Sahni; Francis (2000). Estes autores ressaltam a importância da fibrina no processo de angiogênese pois ela fornece a colonização e a organização dos peptídeos angiogênicos necessários para um efeito máximo nos locais de inflamação ou lesão.

A cascata de coagulação do sangue é iniciada após uma lesão vascular e desencadeia a ativação da trombina, que cliva o fibrinogênio em fibrina. As plaquetas são, então, reunidas em coágulos de fibrina e desempenham um papel fundamental na hemostasia. Tezono et al. (2001) demonstraram que o VEGF ligado ao coágulo atuou como fator de crescimento para células endoteliais, além de atuarem como fator quimiotático para monócitos, sugerindo uma bioatividade do coágulo de fibrina ligado ao VEGF. Durante a análise imunohistoquímica, verificou-se que a grande maioria dos casos de granulomas piogênicos incluídos em nossa amostra apresentava áreas de ulceração recobertas por pseudomembrana serofibrinosa. Nestas áreas houve uma forte marcação pelo VEGF, especificamente nos depósitos de fibrina. Até o momento, não existe na literatura trabalhos destacando este padrão de marcação em granulomas piogênicos de mucosa bucal. Como estas lesões bucais estão constantemente sujeitas

a traumas físicos secundários, e consequente ulceração, a forte expressão do VEGF nestas áreas poderia indicar um potencial mais elevado de angiogênese.

Estudos adicionais são necessários visando elucidar se realmente esta maior expressão de VEGF nas áreas de pseudomembrana nos granulomas piogênicos poderia estar associada com uma microdensidade vascular aumentada, através da utilização de outros marcadores como o CD31, o CD34, dentre outros.

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados, podemos concluir que o granuloma piogênico em mucosa bucal é uma condição patológica relativamente incomum. Acomete preferencialmente mulheres, na faixa etária de 20 a 40 anos de idade, leucodermas, e se localiza com maior prevalência na gengiva. Microscopicamente, a grande maioria destas lesões apresenta-se ulcerada e, nestas áreas de ulceração, há uma intensa imunexpressão do fator de crescimento endotelial vascular.

## REFERÊNCIAS

- AL-KHATEEB, T.; ABABNEH, K. Oral pyogenic granuloma in Jordanians: a retrospective analysis of 108 cases. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 61, n. 11, p. 1285-1288, nov. 2003.
- ANDRIKOPOULOU, M. *et al.* Assessment of angiogenic markers and female sex hormone receptors in pregnancy tumor of the gingiva. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 71, n. 8, p. 1376-81, aug. 2013.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Braz J Pharm Sci**, v. 41, n. 1, p. 27-51, jan./mar. 2005.
- BANJAR, A. *et al.* Labial pyogenic granuloma related to trauma: A case report and mini-review. **Dental Traumatology**, v. 36, n. 4, p. 446-451, aug. 2020.
- BECKER, J.C.; DOMSCHKE, W.; POHLE, T. Biological in vitro effects of fibrin glue: fibroblast proliferation, expression and binding of growth factors. **Scand J Gastroenterol**, v. 39, n. 10, p. 927-932, oct. 2004.
- BONHIN, R.G. *et al.* Correlation between vascular endothelial growth factor expression and presence of lymph node metastasis in advanced squamous cell carcinoma of the larynx. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 81, n. 1, p. 58-62, jan./feb. 2015.
- BRAGADO, R. *et al.* Increased expression of vascular endothelial growth factor in pyogenic granulomas. **Acta Derm Venereol**, v. 79, n. 6, p. 422-5, nov. 1999.
- CANIVELL-ZABALETA, M. *et al.* Extralingival Pregnancy Pyogenic Granuloma on the Lip. **J Craniofac Surg**, v. 29, n. 1, p. e49-e50, jan. 2018.
- COSTA, F.W.G.C. *et al.* Exuberant pyogenic granuloma in extralingival site. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 78, n. 4, p. 134, jul./aug. 2012.
- FÁTIMA, L.A.; PAPA, P.C. Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF): regulação transcricional e pós-transcricional. **Revista da Biologia**, 2010.
- DIAS, E.S.S. *et al.* Pyogenic granuloma in the tongue of a patient with Down syndrome. **Gen Dent**, v. 68, n. 4, p. 61-63, jul./aug. 2020.
- DIKICI, S. *et al.* 2-deoxy-d-ribose (2dDR) upregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) and stimulates angiogenesis. **Microvasc Res**, v. 131, p. 104035, sep. 2020.
- DU, E. *et al.* The critical role of the interplays of EphrinB2/EphB4 and VEGF in the induction of angiogenesis. **Mol Biol Rep**, v. 47, n. 6, p. 4681-4690, jun. 2020.

FREITAS, T.M.C. *et al.* Assessment of angiogenic markers in oral hemangiomas and pyogenic granulomas. **Exp Mol Pathol**, v. 79, n. 1, p. 79-85, aug. 2005.

GIBLIN, A.V. *et al.* Pyogenic granuloma - the quest for optimum treatment: audit of treatment of 408 cases. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**, v. 60, n. 9, p. 1030-5, 2007.

GONÇALES, E.S. *et al.* Pyogenic granuloma on the upper lip: an unusual location. **J Appl Oral Sci**, v. 18, n. 5, p. 538-541, sep./oct. 2010.

GORDÓN-NUÑEZ, M.A. *et al.* Oral pyogenic granuloma: a retrospective analysis of 293 cases in a Brazilian population. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 68, n. 9, p. 2185-8, sep. 2010.

HOWDIESHELL, T.R. *et al.* Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. **J Surg Res**, v. 96, n. 2, p. 173-182, apr. 2001.

JAFARZADEH, H.; SANATKHANI, M.; MOHTASHAM, N. Oral pyogenic granuloma: a review. **J Oral Sci**, v. 48, n. 4, p. 167-75, dec. 2006.

JOHNSON, E.F. *et al.* Vascular tumors in infants: case report and review of clinical, histopathologic, and immunohistochemical characteristics of infantile hemangioma, pyogenic granuloma, noninvoluting congenital hemangioma, tufted angioma, and kaposiform hemangioendothelioma. **Am J Dermatopathol**, v. 40, n. 4, p. 231-239, apr. 2018.

KAMAL, R.; DAHIYA, P.; PURI, A. Oral pyogenic granuloma: Various concepts of etiopathogenesis. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 16, n. 1, p. 79, jan. 2012.

KANDA, N.; WATANABE, S. Regulatory roles of sex hormones in cutaneous biology and immunology. **J Dermatol Sci**, v. 38, n. 1, p. 1-7, apr. 2005.

KLEIN, M. *et al.* Increased expression of the Vascular Endothelial Growth Factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 2, p. 656-658, feb. 2001.

LU, L. *et al.* The effects of biomimetically conjugated VEGF on osteogenesis and angiogenesis of MSCs (human and rat) and HUVECs co-culture models. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 167, p. 550-559, jul. 2018.

MAYMONE, M.B.C. *et al.* Benign oral mucosal lesions: clinical and pathological findings part I- benign oral mucosal lesions. **J Am Acad Dermatol**, v. 81, n. 1, p. 43-56, jul. 2019.

McNAMARA, K.K.; KALMAR, J.R. Erythematous and vascular oral mucosal lesions: a clinicopathologic review of red entities. **Head Neck Pathol**, v. 13, n. 1, p. 4-15, mar. 2019.

MEIJER-JORNA, L.B. *et al.* Proliferation and maturation of microvessels in arteriovenous malformations- expression patterns of angiogenic and cell cycle-dependent factors. **J Cutan Pathol**, v. 39, n. 6, p. 610-20, jun. 2012.

MELINCOVICI, C.S. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis. **Rom J Morphol Embryol**, v. 59, n. 2, p. 455-467, 2018.

PARK, S.H. *et al.* A research of pyogenic granuloma genesis factor with immunohistochemical analysis. **J Craniofac Surg**, v. 28, n. 8, p. 2068-2072, nov. 2017.

PIRES, F.R. *et al.* Clinicopathologic features, microvessel density, and immunohistochemical expression of ICAM-1 and VEGF in 15 cases of secondary syphilis with oral manifestations. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 121, n. 3, p. 274-81, mar. 2016.

RAVI, D. *et al.* Angiogenesis during tumor progression in the oral cavity is related to reduced apoptosis and high tumor cell proliferation. **Oral Oncol**, v. 34, n. 6, p. 543-548, nov. 1998.

RIBEIRO, J.L. *et al.* Oral pyogenic granuloma: An 18-year retrospective clinicopathological and immunohistochemical study. **J Cutan Pathol**, v. 48, n. 7, p. 863-869, jul. 2021.

SAHNI, A; FRANCIS, C.W. Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation. **Blood**, v. 96, n. 1, p. 3772-3778, dec. 2000.

SARAVANA, G.H.L. Oral pyogenic granuloma: a review of 137 cases. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 47, n. 4, p. 318-9, jun. 2009.

SHARMA, Supriya. *et al.* Heterogeneous conceptualization of etiopathogenesis: Oral pyogenic granuloma. **Natl J Maxillofac Surg**, v. 10, n. 1, p. 3-7, jan./jun. 2019.

TAKAHASHI, K. *et al.* Cellular markers that distinguish the phases of hemangioma during infancy and childhood. **J Clin Invest**, v. 93, n. 6, p. 2357-2364, jun. 1994.

TEZONO, K. *et al.* Bioactivity of the vascular endothelial growth factor trapped in fibrin clots: production of IL-6 and IL-8 in monocytes by fibrin clots. **Haemostasis**, v. 31, n. 2, p. 71-79, mar./apr. 2001.

THOMPSON, L.D.R. Lobular capillary hemangioma (pyogenic granuloma) of the oral cavity. **Ear Nose Throat J**, v. 96, n. 7, p. 240-240, jul. 2017.

TRENTO, C.L. *et al.* Gravidarum granuloma associated to an osseointegrated implant:

case report. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 43, n. 2, p. 148-152, 2014.

YUAN, K.; JIN, Y.; LIN, M.T. The detection and comparison of angiogenesis – associated factors in pyogenic granuloma by immunohistochemistry. **J Periodontol**, v. 71, n. 5, p. 701-709, may. 2000.

YUAN, K.; WING, L.C.; LIN, M.T. Pathogenetic roles of angiogenic factors in pyogenic granulomas in pregnancy are modulated by female sex hormones. **J Periodontol**, v. 73, n. 7, p. 701-708, jul. 2002.

YUAN, K.; LIN, M.T. The roles of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 in the regression of pregnancy pyogenic granuloma. **Oral Dis**, v. 10, n. 3, p. 179-85, may. 2004.

## APÊNDICE 1: Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Unifal-MG.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALFENAS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** IMUNOEXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR EM GRANULOMAS PIOGÊNICOS

**Pesquisador:** João Adolfo Costa Hanemann

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 40303820.8.0000.5142

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.516.060

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto apresentado ao Programa de PG Ciências Odontológicas.

Financiamento Próprio.

Não apresenta indícios de conflito de interesse.

A presença de lesões proliferativas na cavidade bucal representa um desafio diagnóstico, devido à grande variedade de condições que podem se apresentar clinicamente de forma semelhante. O granuloma piogênico é um representante dessas lesões proliferativas que representa uma resposta exagerada a uma irritação crônica de baixo grau, com intensa proliferação vascular, cuja patogênese ainda continua incerta. Clinicamente, se apresenta como pápula ou nódulo exofítico, eritematoso, de base sésil ou pediculada, com superfície friável, lisa ou lobulada, que pode estar ulcerada e coberta por pseudomembrana serofibrinosa, sendo a gengiva afetada em 75% dos casos. Sua principal característica histológica é a presença de intensa proliferação vascular. A angiogênese é um fenômeno bastante complexo regulado por fatores de inibição e de estimulação da proliferação vascular, o desequilíbrio desses fatores leva a uma angiogênese fisiológica ou patológica. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma glicoproteína pró-inflamatória de 45kDa, que é expressa no citoplasma e membrana de vários tipos celulares, tanto em tecidos normais, como de tecidos alterados, tendo um importante papel em etapas críticas do processo angiogênico. Dessa forma, inúmeros trabalhos têm sido realizados com o objetivo de se utilizar o VEGF de forma mais eficiente como alvo ou agente terapêutico em doenças onde a angiogênese

**Endereço:** Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

**Bairro:** centro

**CEP:** 37.130-001

**UF:** MG

**Município:** ALFENAS

**Telefone:** (35)3701-9153

**Fax:** (35)3701-9153

**E-mail:** comite.etica@unifal-mg.edu.br



## APÊNDICE 1: Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Unifal-MG (continuação).

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALFENAS



Continuação do Parecer: 4.516.060

Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_COMPROMISSO_PARA_DESENVOLVIMENTO_DE_PROTocol_OS.pdf	14/01/2021 11:46:50	João Adolfo Costa Hanemann	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TAI_Larissa_final.pdf	14/01/2021 11:46:14	João Adolfo Costa Hanemann	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Larissa_Plataforma_Brasil.pdf	19/11/2020 21:14:20	João Adolfo Costa Hanemann	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TCUD_Larissa_ok.pdf	19/11/2020 17:18:01	João Adolfo Costa Hanemann	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE_Larissa.pdf	19/11/2020 17:17:30	João Adolfo Costa Hanemann	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Larissa_ok.pdf	19/11/2020 17:16:15	João Adolfo Costa Hanemann	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

ALFENAS, 29 de Janeiro de 2021

Assinado por:

**DANIEL AUGUSTO DE FARIA ALMEIDA**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

**Bairro:** centro

**CEP:** 37.130-001

**UF:** MG

**Município:** ALFENAS

**Telefone:** (35)3701-9153

**Fax:** (35)3701-9153

**E-mail:** comite.etica@unifal-mg.edu.br

## APÊNDICE 2: Formulário de coleta de dados.

### PROJETO DE PESQUISA

Imunexpressão de Fator de Crescimento Endotelial Vascular em Granulomas Pionógicos

Mestranda: Larissa Couto de Freitas

Orientador: Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann

Coorientador: Profa. Dra. Carine Evelyn de Oliveira

Colaborador: Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira



	<b>Iniciais do paciente:</b>	<b>Número no estudo:</b>		
	<b>Número do laudo AP:</b>			
1.	Idade: ____ anos			
2.	Gênero:    1( ) Masculino	2( ) Feminino	3( ) NI	
3.	Cor:        1( ) <del>Leucoderma</del>	2( ) Feoderma	3( ) <del>Melanoderma</del>	4( ) NI
4.	Gestante:  1( ) Sim	2( ) Não	3( ) Não se aplica	4( ) NI
5.	Recidiva:  1( ) Sim	2( ) Não		
6.	Locais acometidos pelas lesões:			
	1( ) Gengiva anterior superior	2( ) Gengiva posterior superior	3( ) Gengiva anterior inferior	
	4( ) Gengiva posterior inferior	5( ) Lábio superior	6( ) Lábio inferior	
	7( ) Mucosa jugal	8( ) Língua	9( ) NI	
7.	Aspecto clínico da lesão:			
	1( ) Nódulo sésil	2( ) Nódulo pediculado	3( ) Tumefação	4( ) Nódulo
	5( ) NI			
8.	Tamanho da lesão:			
	1( ) Até 1cm	2( ) Entre 1 e 2cm	3( ) Entre 2 e 4cm	4( ) Mais de 4cm
	5( ) NI			
9.	Diagnóstico clínico:			
	1.	2.	3.	
	4.	5.	6.	
<b>ANÁLISE MICROSCÓPICA (HE)</b>				
10.	Epitélio			
	1( ) Normal	2( ) Atrófico	3( ) Hiperplásico	
11.	<del>Úlceração.</del>			
	0( ) Ausente	1( ) Presente		
<b>ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA (VEGF)</b>				
12.	Intensidade			
	0( ) Ausente	1( ) Discreto	2( ) Moderado	3( ) Moderado
13.	Quantidade:			
	0( ) Ausente	1( ) Até 30%	2( ) Entre 30 e 60%	3( ) Mais de 60%
14.	Intensidade X Quantidade			
	0( )	1( )	2( )	3( )
			4( )	6( )
				9( )

\* OBSERVAÇÕES: