

**KARUZA MARIA ALVES PEREIRA**

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS  
FATORES DE REABSORÇÃO ÓSSEA EM  
LESÕES CENTRAIS E PERIFÉRICAS  
DE CÉLULAS GIGANTES**

**NATAL/RN  
2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL**

# **EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS FATORES DE REABSORÇÃO ÓSSEA EM LESÕES CENTRAIS E PERIFÉRICAS DE CÉLULAS GIGANTES**

**Tese apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Patologia Oral da  
Universidade Federal do Rio Grande  
do Norte como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Doutora em  
Patologia Oral.**

**Doutoranda: Karuza Maria Alves Pereira**

**Orientador: Prof. Dr. Antônio de Lisboa Lopes Costa**

**NATAL/RN  
2010**

**Sempre é preciso saber quando uma etapa chega ao final... Se insistirmos em permanecer nela mais do que o tempo necessário, perdemos a alegria e o sentido das outras etapas que precisamos viver. “Tudo o que chega, chega sempre por alguma razão” (FERNANDO PESSOA).**



*A Deus, criador de todas as coisas, meu porto seguro. Senhor, sempre confiei em Ti, e quando desanimava, Tu porém me fortalecia. Por isso, estou aqui.*

*“Porque o Senhor é bom e eterna é sua misericórdia” (Sl 99).*

*Aos meus Pais, Wilita e Fernandes, exemplos de honestidade, dignidade e caráter. Que não medem esforços por mim, sonham e choram comigo, e que sempre estiveram presentes me incentivando, acreditando mais em mim do que eu mesma.... Vocês são a verdadeira expressão do amor incondicional. Palavras não conseguem expressar o quanto vocês são importantes na minha vida. Minha Mãe e Meu Pai, vocês são dádivas de Deus na minha vida!!!*



## AGRADECIMENTOS

*Ao Meu querido orientador, Dr. Antônio de Lisboa Lopes Costa, quem eu ousei chamá-lo de Pai (patológico), ensinou-me a arte de fazer ciência de forma simples, despretensiosa e empolgante. Pelo incentivo, por acreditar no meu potencial, pela confiança em mim depositada durante toda minha pós-graduação, enfim, muito obrigada por tudo!*

*À Profa. Dra. Hébel, exemplo de seriedade e beleza da docência; pelo carinho, atenção, ternura, momentos alegres vivenciados, pelos conhecimentos transmitidos, sejam no âmbito profissional como também no pessoal, e pela sincera e admirável amizade que nos vincula. Minha mãezinha patológica...*

*À Profa. Dra. Lélia Batista, exemplo de amor e dedicação ao saber, que incansavelmente nos impulsiona a busca da excelência na difícil área da Patologia Oral; por toda sua contribuição no meu amadurecimento profissional, pela sua sinceridade, estímulo, confiança e amizade. Sou sua afilhada...*

*À Dra. Roseana, exemplo de coerência, sensatez, competência e maneira simples de ser e lidar com a causa acadêmica; pelo sorriso acolhedor, pelas suas orientações, pela simpatia e solicitude apresentadas ao longo desses anos.*

*Aos Professores: Dr. Leão, Dra. Lélia Maria e Dra. Ana Myriam, exemplos de simplicidade no exercício docente, muito obrigada pelo acolhimento, disponibilidade e pelos ensinamentos transmitidos.*

*À professora e amiga Dra. Márcia Miguel, com a qual pude conviver desde o mestrado, como colega de pós-graduação e agora como professora deste conceituado o programa; Miguel, mesmo com os nossos gostos sendo totalmente diferentes, aprendi muito com você. Exemplo de determinação e inteligência humana. Meu sincero agradecimento por tudo!*

*E à mais nova professora: Dra. Ericka Janine (Erickinha), exemplo de perseverança e simplicidade; pela amizade, por nossas conversas e brincadeiras, pela presteza inigualável e aprendizagem compartilhada.*

*Ao Prof.Dr.Kenio Costa Lima pela imensa ajuda, compromisso, presteza e competência na análise estatística desse trabalho. E também pelos momentos alegres e descontraídos que vivenciamos.*

*Especial a Roberta Barroso Cavalcante, foi a pessoa que Deus colocou no meu caminho desde a graduação e pude seguir na Patologia Oral graças a seu incentivo e sua confiança. Amizade que foi solidificada durante a pós-graduação. “Robes”, muito obrigada por tudo, pelos seus ensinamentos, pela convivência ímpar e pela sua cordial e fiel amizade... Minha irmã mais velha...*

*Aos grandes amigos: Gustavo Godoy (Gustavito) e Cassiano Nonaka (Japa), pessoas importantíssimas durante esses anos.... Gustavito, pelo seu acolhimento desde quando cheguei a Natal... E com o seu sorriso cristalino, sempre abrilhantando todos os locais por onde passa... norteando-me em algumas situações, ensinando-me a gostar mais ainda da patologia, obrigada pela suas palavras amigas, momentos alegres e engraçados vivenciados e por muito mais... Japa, pela sua paciência, sinceridade, pela ajuda de forma desinteressada e efetiva e por todo seu conhecimento científico-patológico compartilhado. Saiba que você contribuiu muito para meu crescimento... Queridos Gustavo e Cassiano, meu profundo agradecimento pela amizade verdadeira de vocês! Serei eternamente grata por tudo que vocês fizeram por mim ao longo desses anos...*

*À Danielle (Dani) pelo seu companheirismo e pelas orações; mesmo você lá em Manaus, distância física, mas amizade espiritual...*

*Aos meus amigos-colegas de turma do doutorado: Cristina (“Presepe”), George e Pollianna. Cada um do seu jeito influenciou nessa caminhada. Muitos momentos partilhados... Estudos, alegrias, angústias, enfim, foi muito bom participar dessa turma de doutorado.*

*Aos meus colegas de pós-graduação atuais: Bruna Amaral (minha irmãzinha querida), Pedro Paulo, Valéria, Ruth, Bruna Rafaela, Marcelo, Betânia, Déborah, Betânia, Marianne, Emeline, Cíntia, Joabe, Maiara, Thais,*

*Adriana, Anna Rafaella, Alessandra e Alexandre. Pelas lutas diárias vivenciadas...*

*Aos meus eternos amigos que tive o imenso prazer de conhecê-los, conviver e partilhar momentos maravilhosos na pós-graduação: Manuel Górdon(Manolino), Marta (Mãe da Pan), Fernanda, Carmem, Antônio Luiz, Simone, Rosilene, Márcio, Janaína, João Goulart, Sormani. Mesmos distantes fisicamente somos amigos!!! Obrigada por vocês terem feito parte dessa história...*

*E meus amigos que mesmo distantes me incentivam e alegram: Nayde, Lidiana, Cláudio, Jô, Ivana, Tiago, Geresa, Maurício, Gleice, Anna, Carmen Piagge, Marcelo Dias, Márcia Maia, Jorge, Jomar; Familiares: minha priminha Wlândia e Guilinha, Tia Mazé, Tia Wildes, Tia Maina, Maria Clara e Maria Luiza, meus avós... pela ternura, confiança, carinho... todos vocês representam o humano amor de Deus na minha vida!*

*Aos queridos funcionários: Gracinha, Sandrinha (meu anjinho), Hévio, Lourdinha, Canindé, Idelzuíte, Clécia, Cecília, Ocean, pela simpatia, solicitude gentileza em que sempre me atenderam prontamente....*

*A Universidade Federal do Ceará (UFC), por viabilizar a conclusão desta etapa. E aos meus colegas de disciplina da UFC-Campus Sobral: grande amigo Fábio Wildson, Marcelo Ferraro, Alexandre Nogueira e Ernest. Além dos meus mais novos amigos de trabalho: Hellíada, Delane, Alfredo, Mário...*

*Ao CNPq, pelos recursos financeiros disponibilizados, tornando possível a execução deste trabalho.*

*E a todos que não citei o nome, mas sei que foram importantes para a conquista do meu doutorado.*



## RESUMO

As Lesões de Células Gigantes, tanto as Lesões Centrais (LCCG) quanto as Periféricas (LPCG), correspondem a um grupo de lesões orais que apresentam-se histologicamente semelhantes, porém demonstram um comportamento clínico variável. O propósito deste estudo foi comparar a expressão imuno-histoquímica dos fatores de reabsorção óssea RANK (Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B), RANKL (Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B) e OPG (Osteoprotegerina) entre LCCG e LPCG. Adicionalmente, esses fatores foram analisados nas LCCG quanto à agressividade destas. A amostra consistiu de 61 casos, sendo 30 casos de LPCG e 31 de LCCG (16 não-agressivos e 15 agressivos). A análise foi realizada por meio da quantificação das células mononucleadas (MO) e células gigantes multinucleadas (CG) imunopositivas aos anticorpos anti-RANK, anti-RANKL e anti-OPG, em 10 campos. Além disso, de acordo com a proporção entre quantidade total de células positivas para RANKL e para OPG, os casos foram categorizados em: RANKL>OPG, OPG>RANKL e RANKL=OPG. As LCCG apresentaram maior quantidade de MO ( $p=0,002$ ) e células totais ( $p=0,003$ ) positivas para RANKL, em comparação com as LPCG. As LCCG ainda revelaram uma associação significativa com a proporção de RANKL>OPG ( $p=0,001$ ). A análise dos fatores de reabsorção óssea não revelou diferenças significativas entre LCCG agressivas e não-agressivas ( $p>0,05$ ). Foi constatada correlação positiva dos marcadores entre si, bem como uma correlação negativa entre o tamanho das lesões e a quantidade de MO ( $p=0,004$ ) e células totais ( $p=0,009$ ) positivas para OPG. Diante desses resultados, conclui-se que o maior potencial reabsortivo das LCCG frente às LPCG pode ser decorrente da elevada expressão de RANKL. Além disso, as diferenças nos comportamentos biológicos de LCCG agressivas e não-agressivas parecem não estar relacionadas com a expressão desses fatores de reabsorção óssea.

**PALAVRAS-CHAVES:** Lesão Central de Células Gigantes, Lesão Periférica de Células Gigantes, RANKL, RANK, OPG, Fatores de reabsorção óssea, Imuno-histoquímica.



## ABSTRACT

The Giant Cell Lesions, both the Central Giant Cells Lesions (CGCL) as the Peripheral Giant Cells Lesions (PGCL), correspond to a group of oral lesions that are histologically similar entities; however they show a variable clinical behaviour. The purpose of this study was to compare the immunohistochemical expression of bone resorption factors RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B), RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand) and OPG (Osteoprotegerin) between CGCL and PGCL. Additionally, these bone resorption factors were examined in terms of aggressiveness of these lesions. The sample consisted of 61 cases, 30 cases of PGCL and 31 CGCL (16 non-aggressive and 15 aggressive). The analysis was performed by quantification of mononuclear cells (MO) and giant multinucleated cells (CG) immunopositive to anti-RANK, anti-RANKL and anti-OPG antibodies in 10 fields. Moreover, according to the proportion between the amount of cells positive for RANKL and OPG, the cases were categorized into: RANKL>OPG, OPG>RANKL e RANKL=OPG. CGCL showed a higher amount of MO ( $p=0.002$ ) and total cells ( $p=0.003$ ) both positives to RANKL compared with the PGCL. Additionally, the CGCL revealed a significant association with the ratio of RANKL>OPG ( $p=0.001$ ). Analysis of the bone resorption factors revealed no significant differences between aggressive and non-aggressive CGCL ( $p>0.05$ ). It was observed a positive correlation between the markers themselves, and a negative correlation between lesion size and quantity of OPG positive MO cells ( $p=0,004$ ) and total cells ( $p=0,009$ ). Through these results, we suggest that the greatest CGCL resorptive potential compared to the PGCL, may have occurred to the high expression of RANKL. Furthermore differences in the biological behavior of aggressive and non-aggressive CGCL appear to be related to the expression of these bone resorption factors.

**KEY-WORDS:** Central Giant Cell Lesion, Peripheral Giant Cell Lesion, RANKL, RANK, OPG, Bone resorption factors, Immunohistochemical.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS	PÁGINA
<b>Figura 01.</b> Regulação da osteoclastogênese através das moléculas RANKL-RANK-OPG.	42
<b>Figura 02.</b> Distribuição dos casos de Lesão de células gigantes de acordo com a localização das lesões.	61
<b>Figura 03.</b> Distribuição dos casos de Lesões centrais de células gigantes segundo a imagem radiográfica.	61
<b>Figura 04.</b> Distribuição dos casos das Lesões centrais de células gigantes não-agressivas e agressivas de acordo com a imagem radiográfica.	62
<b>Figura 05.</b> Fotomicrografia de Lesão Periférica de Células Gigantes destacando a presença de inúmeras células gigantes multinucleadas (H/E 200×).	74
<b>Figura 06.</b> Fotomicrografia de Lesão Central de Células Gigantes exibindo células mononucleadas de morfologia variada entremeadas por células gigantes multinucleadas em espécime bem vascularizado (H/E, 200×).	74
<b>Figura 07.</b> Fotomicrografia exibindo imunopositividade para RANK nas células gigantes e mononucleadas em lesão central de células gigantes (LSAB, 400×).	75
<b>Figura 08.</b> Fotomicrografia destacando as células gigantes imunomarcadas para RANK em lesão periférica de células gigantes (LSAB, 400×).	75
<b>Figura 09.</b> Fotomicrografia exibindo imunopositividade para RANKL nas células mononucleadas em lesão central de células gigantes (LSAB, 400×).	76
<b>Figura 10.</b> Fotomicrografia demonstrando marcação para RANKL nas células mononucleadas em lesão periférica de células gigantes (LSAB, 400×).	76
<b>Figura 11.</b> Fotomicrografia exibindo expressão imuno-histoquímica da OPG nas células mononucleadas em lesão central de células gigantes (LSAB, 400×).	77
<b>Figura 12.</b> Fotomicrografia destacando imunomarcção para OPG nas células multinucleadas e mononucleadas em lesão periférica de células gigantes (LSAB, 400×).	77



## LISTA DE TABELAS

QUADROS	PÁGINA
<b>Quadro 1</b> Clone, especificidade, diluição, tratamento de recuperação e tempo de incubação dos anticorpos utilizados.	57
<b>TABELAS</b>	
<b>Tabela 01.</b> Valores de médias e desvio padrão da quantidade de células marcadas em cada anticorpo, conforme o tipo celular e lesão.	64
<b>Tabela 02.</b> Valores de médias e desvio padrão da quantidade de células marcadas em cada anticorpo nas lesões de células gigantes, conforme o tipo celular e agressividade	64
<b>Tabela 03.</b> Tamanho da amostra, medianas, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para a quantidade de células marcadas de cada anticorpo em relação ao tipo de lesão	65
<b>Tabela 04.</b> Tamanho da amostra e porcentagem da proporção RANKL/OPG em relação ao tipo de lesão.	66
<b>Tabela 05.</b> Tamanho da amostra, medianas, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para cada anticorpo e tipo celular, em relação ao tamanho das lesões categorizado nas lesões de células gigantes.	67
<b>Tabela 06.</b> Tamanho da amostra, medianas, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística KW e significância estatística para a quantidade de células marcadas de cada anticorpo, em relação às lesões não-agressivas, agressivas e periféricas de células gigantes.	68
<b>Tabela 07.</b> Tamanho da amostra, medianas, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e sua significância estatística para os anticorpos RANK,RANKL e OPG, conforme o tipo celular em relação à agressividade nas lesões centrais de células gigantes.	69
<b>Tabela 08.</b> Tamanho da amostra e porcentagem da proporção RANKL/OPG em	70

relação aos tipos de lesões.

- Tabela 09.** Coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ) e sua significância estatística entre a marcação dos anticorpos RANK, RANKL e OPG nos diferentes tipos celulares em lesões de células gigantes. 71
- Tabela 10.** Coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ) e sua significância estatística entre a marcação dos anticorpos RANK, RANKL e OPG nos tipos celulares segundo o tamanho nas lesões de células gigantes. 72
- Tabela 11.** Coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ) e sua significância estatística entre a marcação dos anticorpos RANK, RANKL e OPG nos tipos celulares, segundo o tamanho das lesões nas Lesões Centrais de células gigantes. 72
- Tabela 12.** Coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ) e sua significância estatística entre a marcação dos anticorpos RANK, RANKL e OPG nos tipos celulares, segundo o tamanho das lesões nas Lesões Periféricas de células gigantes. 73



## SIGLAS E ABREVIATURAS

**CG-** Célula Gigante Multinucleada

**CEC-** Carcinoma Epidermóide

**ELISA-** Ensaio Imunoenzimático

**IgG-** Imunoglobulina da classe G

**IL** – Interleucina

**LCCG** – Lesão Central de Células Gigantes ou Lesões Centrais de Células Gigantes

**LPCG** - Lesão Periférica de Células Gigantes ou Lesões Periféricas de Células Gigantes

**MO-** Célula Mononucleada

**OPG-** Osteoprotegerina

**M-CSF-** Fator Estimulante de Colônia de Monócitos

**PCR-** Do inglês “Polymerase Chain Reaction”, traduzido como Reação da Polimerase em Cadeia

**p53-** Proteína codificada pelo gene p53 (conhecido como gene guardião do genoma humano)

**PTHrP-** Peptídeo relacionado ao Paratormônio

**PTHR1-** Receptor do Paratormônio do Tipo 1

**RANK** - Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B

**RANKL-** Ligante para Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B

**RNA<sub>m</sub>**- Ácido Ribonucléico (RNA) mensageiro

**RT-PCR** – PCR *Real Time*

**TCG** – Tumor de Células Gigantes

**TNF** - Fator de Necrose Tumoral

**TNFR-** Receptor do Fator de Necrose Tumoral

**TRAF-** Fatores Associados com o receptor TNF

**TRAP** - Fosfatase Ácida Tartarato Resistente



## SUMÁRIO

**Resumo**

**Abstract**

**Lista de ilustrações**

**Lista de Tabelas**

**Siglas e Abreviaturas**

	<b>Página</b>
<b>1. Introdução .....</b>	25
<b>2. Revisão de literatura .....</b>	28
<b>2.1. Lesão de Células Gigantes.....</b>	28
<b>2.2. Reabsorção óssea</b>	38
<b>2.2.1. Considerações gerais .....</b>	38
<b>2.2.2. Fatores de reabsorção óssea em lesões de células gigantes .....</b>	46
<b>3. Proposição.....</b>	51
<b>4. Material e Métodos .....</b>	53
<b>4.1. Implicações éticas .....</b>	53
<b>4.2. Caracterização do estudo.....</b>	53
<b>4.3. População .....</b>	53
<b>4.4. Amostra .....</b>	53
<b>4.5. Critérios de seleção da amostra .....</b>	54
<b>4.5.1. Critérios de inclusão .....</b>	54
<b>4.5.2. Critérios de exclusão .....</b>	54
<b>4.6. Estudo morfológico .....</b>	54
<b>4.7. Estudo imuno-histoquímico .....</b>	55
<b>4.8. Análise da marcação imuno-histoquímica.....</b>	57
<b>4.9. Análise estatística .....</b>	58
<b>5. Resultados.....</b>	60
<b>5.1. Caracterização geral da amostra.....</b>	60
<b>5.2. Resultados imuno-histoquímicos .....</b>	63
<b>5.3. Análise estatística.....</b>	65

<b>6. Discussão .....</b>	<b>79</b>
<b>7. Conclusões .....</b>	<b>94</b>
<b>Referências</b>	
<b>Anexo</b>	
<b>Apêndices</b>	



## 1 INTRODUÇÃO

As lesões de células gigantes constituem um grupo de lesões da cavidade oral que podem ocorrer tanto na forma intra-óssea (Central) quanto extra-óssea (Periférica). As lesões centrais de células gigantes (LCCG) e lesões periféricas de células gigantes (LPCG) são idênticas histologicamente, caracterizadas pela presença de células mononucleadas de morfologia fusiforme e ovóide, além das células gigantes multinucleadas (TIFFEE; AUFDEMORTE, 1997; LIU; YU; LI, 2003; NEVILLE et al., 2009). Porém, estas lesões têm comportamento clínico variável e diferente (SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000; FLÓREZ-MORENO et al., 2008; HOUPIS et al., 2009).

Considerando o comportamento clínico das lesões de células gigantes, as LPCG raramente causam reabsorção óssea e têm baixa taxa de recorrência, enquanto as LCCG apresentam-se ora indolentes, ora mais agressivas, demonstrando crescimento rápido, reabsorção óssea e tendência à recorrência após remoção cirúrgica (FLÓREZ-MORENO et al., 2008). Alguns pesquisadores acreditam que a LCCG deve ser considerada como uma lesão reativa, porém outros estudos têm documentado casos agressivos e recorrentes, remetendo à noção de que esta lesão seja um neoplasma verdadeiro (REGEZI, 2002; POGREL, 2003; VERED; BUCHER; DAYAN, 2006b).

Tem sido descrito na literatura que a biologia da reabsorção óssea envolve três moléculas-chave: RANK (Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B), RANKL (Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B) e OPG (Osteoprotegerina), essas moléculas foram descobertas recentemente, sendo componentes regulatórios da formação, ativação, sobrevivência e função dos osteoclastos (KHOSLA et al., 2001; BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; TOBÓN-ARROYAVE et al., 2005). Atualmente é reconhecido que pesquisas que envolvam reabsorção óssea, devam analisar o sistema RANK-RANKL-OPG (GALLAGHER, 2008), pois essas moléculas são fatores-chaves na regulação do metabolismo ósseo (HUANG et al., 2000; CROTTI et al., 2003; TAY et al., 2004; ANANDARAJAH, 2009).

Alguns estudos foram realizados analisando estes fatores envolvidos na reabsorção óssea (RANKL, RANK e OPG) em diversas lesões odontogênicas e patologias orais (CROTTI et al., 2003; ITONAGA et al., 2003; LIU; YU; LI, 2003; TAY et al., 2004; TOBÓN-ARROYAVE et al., 2005; MENEZES et al., 2006; VERNAL et al., 2006; BOSTANCI et al., 2007; SILVA et al., 2008; ANDRADE et al., 2008). Porém, poucos estudos foram realizados comparando as lesões de células gigantes centrais com as lesões periféricas.

Dessa maneira, esse trabalho teve como objetivo verificar se o comportamento biológico distinto entre as lesões de células gigantes centrais e periféricas pode ser devido a diferenças na expressão dos fatores de reabsorção óssea (RANK, RANKL, OPG) entre essas lesões, bem como dentre as diferentes formas de apresentação clínica entre as lesões centrais.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LESÃO DE CÉLULAS GIGANTES

Muitas lesões dos maxilares contêm células gigantes multinucleadas (CG), dentre elas destaca-se: lesão central de células gigantes (LCCG), tumor marrom do hiperparatireoidismo, querubismo, cisto ósseo aneurismático e lesão periférica de células gigantes (LPCG), devido a preponderância das CG nessas lesões (SAPP; EVERSOLE; WY SOCK, 1999; REGEZI, 2002; LI; YU; LI 2003; NEVILLE et al., 2009).

A Lesão Central de Células Gigantes foi descrita primeiramente por Jaffe em 1953 (de LANGE; van der AKKER, 2005), reconhecida inicialmente como um processo reparativo, sendo então denominada granuloma reparativo de células gigantes. Embora a LCCG não seja um processo inflamatório granulomatoso verdadeiro, o termo granuloma ainda tem persistido para designar essa lesão (REGEZI, 2002). Atualmente, essas lesões são designadas como granuloma de células gigantes, ou pelo termo lesão de células gigantes, sendo preferível este último (REGEZI, 1997; NEVILLE et al., 2009).

A origem exata para as lesões centrais e periféricas de células gigantes ainda permanece incerta, provavelmente originam-se do ligamento periodontal ou mucoperiósteo ou centralmente no osso. Essas lesões podem ocorrer tanto intra-óssea quanto periféricamente na cavidade oral e ambas são idênticas histologicamente, caracterizadas pela presença de inúmeras células gigantes multinucleadas (FLANAGAN; TINKLER; WILLIAMS 1988; TIFTEE; AUFDEMORTE, 1997; GÜNHAN et al., 1998; LI; YU; LI, 2003). Porém essas lesões apresentam comportamento clínico variável e em alguns casos bem distinto (SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000; FLÓREZ-MORENO et al., 2008; HOUPIS et al., 2009).

A patogênese das lesões de células gigantes ainda não está esclarecida (SOUZA et al., 1999; KAUZMAN et al., 2004; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; DE LANGE et al., 2007b). Souza et al. (1999) sugeriram que a inativação da p53 pelo aumento na expressão de MDM2 (*Murine Double Minute*) pode estar

envolvida na patogênese das lesões de células gigantes dos maxilares. Já Kauzman et al. (2004), atribuíram que a desregulação do ciclo celular, devido à expressão aberrante da proteína ciclina-D1 pode estar implicada na patogênese das LCCG.

Estudos recentes têm sugerido que alterações genéticas podem estar relacionadas ao desenvolvimento destas lesões, mais especificamente mutações no gene SH3BP2. Este gene localiza-se no cromossomo 4p16.3 e está associado ao querubismo (DE LANGE et al. 2007a; 2007b; IDOWU et al., 2008; LIETMAN; YIN; LEVINE, 2008; AMARAL et al., 2009; CARVALHO et al., 2009). A proteína SH3BP2 é conhecida por estimular atividade de NFAT (Fator Nuclear de Células T Ativadas), sendo que a NFATc1 (Fator Nuclear de Células T Ativadas isoforma c1) é um importante fator de transcrição na osteoclastogênese (LIETMAN; YIN; LEVINE, 2008).

Amaral et al. (2009) estudaram em lesões de células gigantes (5casos de LPCG e 5de LCCG) a imunoexpressão de NFATc1(Fator Nuclear de Células T Ativadas isoforma c1). Estes pesquisadores encontraram positividade para NFATc1 no núcleo das células gigantes, além de superexpressão desta proteína nas lesões estudadas, sugerindo que o desenvolvimento das lesões de células gigantes pode ser relacionado à expressão de NFATc1 no núcleo das células gigantes.

Alguns pesquisadores acreditam que a LCCG deve ser considerada como uma lesão reacional, porém outros estudos têm documentado casos agressivos e recorrentes, sugerindo que essa lesão seja uma verdadeira neoplasia. Assim, essas lesões continuam sendo alvo de controvérsias, devido a sua natureza: reativa x neoplásica (REGEZI, 2002; POGREL, 2003; VERED; BUCHNER, DAYAN, 2006a). Outra teoria é da hipótese vascular, a qual sugere que a LCCG pertence ao grupo das lesões proliferativas vasculares primárias dos maxilares (KABAN et al., 2002; KABAN et al., 2007).

Outros autores suscitaram ainda a possibilidade das LCCG dos maxilares e o Tumor de Células Gigantes (TCG) dos ossos longos serem um processo

patológico único (SOUZA et al., 1999; ITONAGA et al., 2002; KAUZMAN et al., 2003; KAUZMAN et al., 2004; ARAGÃO et al., 2006; ARAGÃO et al., 2007; RESNICK et al., 2010). O TCG dos ossos longos é descrito como um neoplasma localmente agressivo, localizado preferencialmente na epífise dos ossos longos, sendo o fêmur e a tíbia os principais ossos acometidos, com casos ocasionalmente descritos nos ossos das mãos, pés e sacro (FLETCHER; UNNI; MERTENS, 2002).

As LCCG são lesões relativamente incomuns, perfazendo aproximadamente 7% de todas as lesões ósseas benignas dos maxilares (STAVROPOULOS; KATZ, 2002). As LCCG dos maxilares ocorrem principalmente em pacientes jovens, na 2ª e 3ª décadas de vida e têm predileção pelo sexo feminino. Ocorrem mais frequentemente na mandíbula que na maxila, sendo a região anterior e o corpo mandibular os principais sítios de acometimento (O'MALLEY et al., 1997; REGEZI, 2002; KAUZMAN et al., 2004; SHEDDI; MOSODOMI, 2004; DE LANGE; van den AKKER, 2005; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; KABAN et al., 2007; CARVALHO et al., 2009; SUN et al., 2009; SUSARLA et al., 2009; RESNICK et al., 2010). Aragão et al. (2006) demonstraram uma predileção na localização desta entidade patológica pela maxila (62,5%), sobrepondo-se à mandíbula (37,5%), sendo ambos na região anterior dos maxilares. Neville et al. (2009) ressaltaram que as lesões mandibulares frequentemente cruzam a linha média.

Os aspectos radiográficos são variáveis, apresentando-se como lesão radiolúcida uni ou multilocular, e pode ser confundida com outras lesões, tais como: Tumor marrom do hiperparatireoidismo, displasia fibrosa, cisto ósseo aneurismático e outras lesões ósseas dos maxilares (STAVROPOULOS; KATZ, 2002; SUN et al., 2009).

Baseando-se nas características clínicas e radiográficas tem sido sugerido que as LCCG dos maxilares podem ser divididas em duas categorias: lesões não-agressivas e lesões agressivas. As primeiras representam a maioria dos casos, apresentam pouco ou nenhum sintoma, demonstram crescimento lento e não

causam perfuração da cortical ou reabsorção radicular dos dentes envolvidos. As lesões agressivas são caracterizadas por dor, crescimento rápido, perfuração cortical, reabsorção radicular e elevada tendência à recidiva após tratamento (CHUONG et al., 1986; FICARRA; KABAN; HANSEN, 1987; NEVILLE et al., 2009).

As Lesões Periféricas de Células Gigantes (LPCG) são lesões exofíticas, que ocorrem na gengiva e rebordo alveolar. Estas lesões são comuns, ocorrendo duas vezes mais frequentemente que sua contraparte intra-óssea (MOTAMEDI et al., 2007). A LPCG não é considerada um neoplasma verdadeiro, mas uma lesão reacional em resposta ao trauma crônico ou irritante local (CARVALHO et al., 1995; GÜNHAN et al., 1998; CHAPARRO-AVENDAÑO; AYTÉS; ESCODA, 2005; NEVILLE et al., 2009; HOUPIS et al., 2009).

As LPCG podem desenvolver-se em qualquer idade, embora frequentemente acometam pacientes na 5ª e 6ª décadas de vida com predileção pelo sexo feminino. As lesões podem se localizar tanto na região anterior como na região posterior dos ossos gnáticos, especialmente na gengiva ou rebordo alveolar, sendo a mandíbula ligeiramente mais afetada que a maxila (MIGHELL; ROBINSON; HUME, 1995; BODNER et al., 1997; MOTAMEDI et al., 2007; NEVILLE et al., 2009).

Intraoralmente, a LPCG se apresenta como lesão nodular de coloração vermelho-púrpura, comumente assintomática, que ocasionalmente pode apresentar superfície ulcerada. As LPCG são lesões em tecido mole que raramente afetam o tecido ósseo subjacente, embora este possa sofrer erosão superficial (MIGHELL; ROBINSON; HUME, 1995; BODNER et al., 1997; GÁNDARA REY et al., 2002; CHAPARRO-AVENDAÑO; AYTÉS; ESCODA, 2005; MOTAMEDI et al., 2007).

Considerando o comportamento clínico das lesões de células gigantes, as lesões periféricas raramente causam reabsorção óssea e têm baixa taxa de recorrência, ao passo que, as lesões centrais têm comportamento biológico mais agressivo, sendo caracterizadas por crescimento rápido, dor, reabsorção

radicular, destruição óssea e tendência à recorrência após remoção cirúrgica (FLÓREZ-MORENO et al., 2008).

Histologicamente, as lesões de células gigantes, centrais e periféricas, demonstram a presença de poucas a muitas Células Gigantes multinucleadas (CG), entremeadas com células mononucleares de morfologia ora fusiforme ora ovóide. As células gigantes podem estar agregadas focalmente no tecido lesional ou podem estar dispostas de forma difusa. Essas células variam consideravelmente em tamanho e forma de caso para caso, sendo células grandes e arredondadas, contendo poucos núcleos até 20 ou mais núcleos. O tecido conjuntivo da lesão é do tipo fibroso, sendo geralmente bem vascularizado. Podem ser observadas também áreas hemorrágicas com pigmentos por hemossiderina (FICARRA; KABAN; HANSEN 1987; ITONAGA et al., 2003; CHAPARRO-AVENDAÑO; AYTÉS; ESCODA, 2005; ARAGÃO et al., 2006; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006a; NEVILLE et al., 2009).

Lim e Gibbins (1995) analisaram por imuno-histoquímica e microscopia eletrônica de transmissão as lesões de células gigantes (LCCG e LPCG) e observaram uma relativa falta de reatividade para três marcadores de células endoteliais (antígeno relacionado ao fator VIII, Ulex europaeus lectin-1 e QBend10) nas áreas mais profundas dos espécimes, porém na periferia das lesões observavam-se vasos sanguíneos bem desenvolvidos. Os autores especularam que pode existir uma interação entre anormalidades na microvascularização dessas lesões e a presença das células gigantes.

Acredita-se que ocorra interação entre os três tipos celulares encontrados nas lesões de células gigantes: células fusiformes, células gigantes multinucleadas e células ovóides (da linhagem monocítica/macrofágica), permitindo, assim, a progressão da lesão (LIU; YU; LI, 2003; TOBÓN-ARROYAVE et al., 2005).

As populações celulares presentes nas lesões de células gigantes podem ainda ser subdivididas em células gigantes multinucleadas do tipo I, que exibem um citoplasma levemente basofílico e núcleos vesiculares grandes,

correspondendo às células metabolicamente ativas; célula gigante multinucleada do tipo II, que são menores, com citoplasma eosinofílico e núcleo picnótico; células mononucleares ovóides e células mononucleadas com morfologia fusiforme e núcleo picnótico. A correlação fenotípica e funcional entre as duas últimas populações celulares ainda não foi completamente compreendida (HOUPIS et al., 2009).

A histogênese e os mecanismos envolvidos na formação das células gigantes multinucleadas nas lesões de células gigantes dos maxilares ainda não estão totalmente entendidos (LIU; YU; LI 2003; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006a; FLÓREZ-MORENO et al., 2008).

Carvalho et al. (1995) demonstraram por estudos imuno-histoquímicos e ultraestrutural que as LPCG apresentam uma população celular heterogênea, sendo constituída por 3 tipos celulares mononucleares e 2 tipos de células gigantes multinucleadas. As primeiras são predominantemente células do sistema fagocítico mononuclear, além de fibroblastos e células de Langerhans. Por sua vez, as CG exibiam diferenças morfológicas decorrente de suas atividades metabólicas, sendo um tipo metabolicamente ativo e outro tipo, uma CG em degeneração.

Embora as LPCG sejam lesões extra-ósseas que raramente causam destruição do tecido ósseo, acredita-se que as células gigantes presentes nessas lesões sejam osteoclastos-*like*. A significância dessas células nas lesões extra-ósseas ainda precisa ser elucidada (LIM; GIBBINS, 1995; LIU; YU; LI, 2003).

Tiffe e Aufdemorte (1997) estudaram as características das células gigantes multinucleadas em LPCG e LCCG e observaram que as CG apresentam capacidade de reabsorção óssea, concluindo que essas células são produtos das células de linhagem monocítica-macrofágica com aspectos intermediários entre osteoclastos e macrófagos.

Outros autores acreditam que as células gigantes presentes nas lesões de células gigantes são células osteoclastos-*like* ou verdadeiros osteoclastos, que apresentam fenótipo osteoclástico, sendo derivadas de precursores monocítico-

macrofágicos (FLANAGAN; TINKLER; WILLIAMS, 1988; MIGHELL; ROBINSON; HUME, 1996; ITONAGA et al., 2003; LIU; YU; LI, 2003; HOUPIS et al., 2009). Tem sido descrito que estas células são capazes de causar reabsorção óssea (ITONAGA et al., 2003).

De acordo com Itonaga et al. (2003), as células mononucleadas presentes nas lesões de células gigantes, LCCG, são compostas por uma população heterogênea de células de morfologia ovóide e fusiforme, semelhantes aos macrófagos, fibroblastos ou miofibroblastos e osteoblastos. Se as células consideradas “fibroblastos-like” exercem algum papel na formação das células gigantes e reabsorção óssea nessas lesões é ainda desconhecido.

O'Malley et al. (1997) estudaram as células mononucleares presentes nas LCCG, e, segundo estes autores, as células mononucleares são as responsáveis pelo compartimento proliferativo dessas lesões. Nesse estudo, analisaram imunohistoquimicamente a expressão de CD34, CD68, Fator XIIIa e actina de músculo liso, concluindo que as LCCG são tumores constituídos primariamente por fibroblastos e que os macrófagos parecem exercer um papel secundário na patogênese das LCCG.

Aragão et al. (2007) estudaram a imunoexpressão de proteínas da matriz extracelular, fibronectina e tenascina, e CD68 em LCCG e TCG dos ossos longos e detectaram positividade para o CD68 em muitas células mononucleadas e na maioria das células multinucleadas, sugerindo a existência da origem monocítica/macrofágica para alguns dos componentes celulares dessas lesões.

Vered et al. (2007) analisaram o componente mononuclear das LCCG agressivas e não-agressivas através da imunoexpressão de actina de músculo liso (SMA), quantificando a densidade de miofibroblastos nessas lesões. Estes autores evidenciaram que as LCCG, tanto agressivas quanto as não-agressivas, demonstraram imunopositividade para SMA, porém, sem diferença na densidade dos miofibroblastos entre as LCCG. Assim, sugere-se que os miofibroblastos são componentes celulares integrais destas lesões, mas não distinguível entre as LCCG agressivas e não-agressivas.

Huang et al. (2000) e Lau et al. (2005) ressaltaram que, embora a histogênese dos TCG dos ossos longos, que se assemelham histologicamente às lesões de células gigantes dos maxilares, não esteja completamente elucidada, essas lesões são consideradas originar-se de células mesenquimais que têm a capacidade de recrutamento e diferenciação das células gigantes osteoclasto-*like*.

As células gigantes, presentes nas lesões de células gigantes, podem ser formadas pela fusão de células progenitoras da linhagem monocítica/macrofágica. Como essas lesões, tanto LCCG e LPCG, normalmente são bem vascularizadas, o componente vascular pode providenciar os monócitos da circulação. As células mononucleadas lesionais são provavelmente as responsáveis pelo recrutamento e diferenciação das células gigantes (LIU; YU; LI, 2003; TOBÓN-ARROYAVE et al., 2005).

Aponta-se que a principal porcentagem da atividade proliferativa das lesões de células gigantes encontra-se na população celular mononuclear (MIGHELL; ROBINSON; HUME, 1996; REGEZI, 1997; SOUZA et al., 1999; SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000; KAUZMAN et al., 2004; KRUSE-LÖSLER et al., 2006).

O'Malley et al. (1997) analisaram a expressão imuno-histoquímica do Ki-67 e p53 comparativamente entre casos de LCCG agressivos e não-agressivos, encontrando marcação positiva para Ki-67 somente nas células mononucleadas e não observando diferença no número de células no ciclo celular entre os casos agressivos e não-agressivos, demonstrando também que as CG não representam um componente proliferativas nessas lesões. Com relação à p53, raramente foi detectada a expressão desta proteína nas células mononucleadas. Os autores inferiram que não há diferença marcante no componente celular proliferativo entre as LCCG.

Em 1999, Souza et al. estudaram a expressão de Ki-67, PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular), p53 e MDM2 em LCCG e Tumor de Células Gigantes (TCG), cujos resultados demonstraram ausência de marcação para p53 na amostra analisada, ampla imunorreatividade para MDM2, e maior

percentagem de células Ki-67 e PCNA positivas para os casos de LCCG. Os autores inferiram que esses achados não explicam a diferença no comportamento biológico entre as lesões de células gigantes dos maxilares e TCG ossos longos.

Souza, Mesquita e Gomez (2000) analisaram expressão imuno-histoquímica das proteínas p53, Ki-67, PCNA e MDM2 em LCCG e LPCG, não observando imunoexpressão de p53, bem como diferença na expressão das proteínas estudadas entre as LPCG e LCCG, sugerindo que a expressão desses marcadores pode não refletir o comportamento biológico distinto dessas lesões.

Itonaga et al. (2003) analisaram a proliferação celular nas LCCG, através da marcação do PCNA e observaram imunoexpressão para este marcador somente nas células mononucleadas de morfologia fusiforme. Além disso, essas mesmas células também se apresentaram positivas para vimentina e RANKL. Esses achados sugerem que o componente proliferativo das LCCG é derivado de células mesenquimais, as quais têm capacidade para diferenciar-se em fibroblastos/osteoblastos. Células fibroblastos/osteoblastos-*like* que expressam RANKL são responsáveis por induzir a formação de células gigantes multinucleadas.

Kauzman et al. (2004) analisaram proteínas do ciclo celular (Ciclina D1, Ciclina B1 e Ki-67) em 29 casos de LCCG e observaram uma superexpressão da ciclina D1 nas células gigantes multinucleadas, ao passo que, a imunoexpressão de ciclina B1 e Ki-67 foi restrita às células mononucleadas. Segundo esses autores, a ausência de expressão da proteína Ki-67 nas células gigantes multinucleadas indica que essas células não estão proliferando, e que superexpressão da ciclina D1 pode estar envolvida na formação das células gigantes multinucleadas, provavelmente por estas células pararem na fase G1/S e não entrarem na fase M do ciclo celular.

Kruse-Lösler et al. (2006) analisaram a taxa de proliferação celular em 26 casos de LCCG, verificando imunopositividade para Ki-67 somente nas células mononucleadas, sendo esses casos negativos para p53. Nesse mesmo estudo, os autores dividiram a amostra em casos agressivos (10 casos) e não-agressivos (16

casos), não encontrando diferenças no índice de positividade do Ki-67 entre esses grupos (positividade 4,9% nos casos agressivos e 4,2% nos não-agressivos).

Flórez-Moreno et al. (2008) fizeram análise imuno-histoquímica e citomorfométrica comparativa entre casos de LCCG e LPCG, observando que nas lesões centrais, os núcleos das CG são mais numerosos e maiores em comparação as núcleos das CG nas LPCG. Essa diferença nos parâmetros nucleares nas CG das LCCG pode indicar não somente a fusão de macrófagos residentes e/ou recrutados do sangue, mas também um aumento na atividade metabólica dessas células, o qual pode estar relacionado ao comportamento clínico mais agressivo das lesões centrais. Adicionando, nesse estudo, os autores evidenciaram maior marcação para macrófago (CD68) nas LCCG, o que também sugere que essa expressão intensa pode estar associada com alguns aspectos clínicos, tais como: taxa de crescimento, sintomatologia dolorosa, reabsorção óssea e radicular, devido à liberação de várias citocinas pelos macrófagos.

Quinderé et al. (2008) analisaram, a expressão imuno-histoquímica dos componentes da matriz extracelular, colágeno IV, tenascina-C e fibronectina, em casos de LCCG e LPCG, evidenciando expressão de colágeno IV nas membranas basais perivasculares, com diminuição da intensidade da marcação na periferia para os centros das lesões. Além disso, observou baixa imunoexpressão de tenascina-C nas membranas basais perivasculares das LPCG e diminuição da marcação para fibronectina nas LCCG. Contudo, em conjunto, os resultados obtidos não revelaram diferenças significativas na expressão destas proteínas entre as lesões estudadas.

Dewsnup et al.(2008) e Susarla et al.(2009) estudaram a angiogênese, através da densidade média da imunoexpressão de CD34, nas LCCG agressivas e não-agressivas e encontraram que os níveis de CD34 foram maiores nos casos agressivos, sugerindo que uma elevada positividade para esse marcador pode ser de grande valor preditivo do comportamento biológico mais agressivo nas LCCG, pois a densidade vascular apresenta-se aumentada nas LCCG agressivas.

O tratamento das lesões de células gigantes é variável. As lesões periféricas são tratadas de maneira conservadora, que consiste na excisão cirúrgica local (CHAPARRO-AVENDAÑO; AYTÉS; ESCODA, 2005; NEVILLE et al., 2009; SUN et al., 2009). Já para as lesões centrais, têm sido descritas inúmeras modalidades de tratamento. O manejo cirúrgico geralmente é a curetagem (NEVILLE et al., 2009). Porém, atualmente, as terapias não-cirúrgicas alternativas têm sido amplamente utilizadas. Estas incluem: injeções de esteróides intralesionais e aplicações subcutâneas de calcitonina ou interferon- $\alpha$  (KABAN et al., 2002; POGREL, 2003; FARRIER et al., 2006; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006b; KABAN et al., 2007).

As LCCG devem ser consideradas lesões dinâmicas, nas quais o tratamento terapêutico deve ser ajustado com a evolução da lesão. Vered, Buchner e Dayan (2006b) sugeriram que a marcação imuno-histoquímica para receptores de calcitonina e glicocorticóide pode servir como ferramenta prática e confiável para seleção do agente terapêutico adequado para tratamento dessas lesões, principalmente naqueles casos recorrentes.

## 2.2 REABSORÇÃO ÓSSEA

### 2.2.1 Considerações gerais

A reabsorção óssea é um processo de múltiplas etapas, altamente coordenado, iniciando-se com a proliferação de precursores dos osteoclastos imaturos, seguindo com a diferenciação e maturação desse tipo celular, e finalmente a degradação das matrizes orgânicas e inorgânicas do tecido ósseo (TEITELBAUM, 2000; TAY et al., 2004).

O osteoclasto é uma célula multinucleada, derivada de células precursoras hematopoiéticas pertencentes à família monócito/macrófago, sendo a principal, senão exclusiva, célula responsável pela reabsorção óssea (YASUDA et al., 1998; TEITELBAUM, 2000; GALLAGHER, 2008). Várias citocinas e fatores de

crescimento são cruciais para diferenciação e maturação dessa célula. Dentre esses, podemos citar as interleucinas (IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, IL-15, IL-17, IL-18), Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Fator Estimulante de Colônia de Monócitos (M-CSF). Esses fatores atuam pela estimulação das células progenitoras de osteoclastos ou participando em um sistema parácrino, no qual os osteoblastos e células da medula óssea estão fortemente envolvidos. Este sistema parácrino é essencial para o metabolismo do osso e seus mediadores incluem as moléculas RANK (Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B), ligante para RANK (RANKL) e OPG (Osteoprotegerina). Quando o RANK liga-se ao seu ligante específico, inicia-se a osteoclastogênese (LACEY et al., 1998; KUMAR; FAUSTO; ABBAS, 2005; GALLAGHER, 2008; ANANDARAJAH, 2009).

Muitos hormônios e citocinas têm sido relacionados direta ou indiretamente na osteoclastogênese (LIU; YU; LI, 2003). Fatores locais e sistêmicos, como: vitamina D, Paratormônio (PTH), prostaglandinas E, estão envolvidos na osteoclastogênese (TSUDA et al., 1997; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001). Recentemente, membros da superfamília do TNF: RANK, RANKL e OPG foram identificados (SIMONET et al., 1997; TSUDA et al., 1997; YASUDA et al., 1998; LACEY et al., 1998; HSU et al., 1999).

RANK é um membro da superfamília do receptor do Fator de Necrose Tumoral, que se associa intracelularmente com Fatores associados com receptor TNF (TRAFs) (HSU et al., 1999; TEITELBAUM, 2000). O domínio intracelular do RANK contém dois sítios de ligação, em que cada um reconhece proteínas TRAFs específicas, como TRAF2, TRAF5 e TRAF6 (HSU et al., 1999). O RANK é expresso na superfície dos osteoclastos e seus progenitores, células dendríticas e células T ativadas (BURGESS et al., 1999; DOUGALL et al., 1999).

RANKL, também conhecido como OPGL (Ligante da Osteoprotegerina) ou ODF (Fator de Diferenciação dos Osteoclastos), é um peptídeo de 317 aminoácidos, que existe em duas formas: a mais comum, com 40-45 kDa, a forma ligada à membrana, e a outra com 31kDa, a forma solúvel. Ligante do RANK

também é um membro da família do TNF, sendo considerada a mais importante citocina envolvida em vários estágios da reabsorção óssea. Elevados níveis de RNAm do RANKL têm sido identificados nos tecidos ósseos e medula óssea, bem como nos tecidos linfóides (linfonodos, timo e baço) (TEITELBAUM, 2000; KHOSLA, 2001; ATKINS et al., 2006; GALLAGHER, 2008).

RANKL é uma proteína necessária e importante na osteoclastogênese, pois liga-se ao RANK presente na superfície dos pré-osteoclastos e osteoclastos, induzindo a diferenciação das células progenitoras ósseas, bem como estimula a atividade dos osteoclastos maduros. RANKL é necessário para induzir a expressão de genes que especificam a linhagem osteoclástica, incluindo os genes que codificam a Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (TRAP), catepsina K e receptor para calcitonina, conduzindo assim para o desenvolvimento de osteoclastos maduros (LACEY et al., 1998; BURGESS et al., 1999; KARTSOGIANNIS et al., 1999; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001; BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003 al.; LAU et al., 2005).

RANK medeia os efeitos do RANKL na osteoclastogênese. A ativação do RANK através do seu ligante, RANKL, é seguida pela sua interação com membros da família do receptor associado ao TNF e ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (KHOSLA, 2001), a cascata de sinalização envolve a ativação do fator nuclear  $\kappa$ B, bem como c-jun e via Akt/PKB (HOFBAUER; HEUFELDER, 2001, ANANDARAJAH, 2009). Interação entre o RANKL, expresso nas células mesenquimais/osteoblastos, com o RANK, presente nos precursores dos osteoclastos, é essencial para a osteoclastogênese (YASUDA et al., 1998; HSU et al., 1999; KONG et al., 1999). A ativação do RANK pela ligação com o RANKL induz a osteoclastogênese, aumentando o rearranjo do citoesqueleto da célula multinucleada, suficiente para iniciação da reabsorção óssea (BURGESS et al., 1999; DOUGALL et al., 1999; HSU et al., 1999).

Trabalhos iniciais envolvendo RANKL, como o de Kong et al.(1999), observaram em ratos, com mutação no gene RANKL(OPGL-), o desenvolvimento de osteopetrose, além de ausência na erupção dentária nestes animais, sugerindo

que a falha na erupção dos dentes ocorreu devido à diminuição da reabsorção óssea, não propiciando o espaço requerido para a movimentação dentária. Nesse mesmo estudo, analisando histologicamente as lâminas do experimento, os autores não evidenciaram células que exibissem morfologia de osteoclasto, inferindo a absoluta dependência da expressão do RANKL na maturação e diferenciação dos osteoclastos.

Rani e Macdougall (2000), através de estudo com cultura de células de odontoblastos e células da polpa indiferenciadas, detectaram por RT-PCR (PCR *Real Time*) a expressão de RNAm de OPG e RANKL em células da polpa dentária e odontoblastos, mostrando que essas células também expressam os fatores estimulador e inibidor da osteoclastogênese e reabsorção óssea.

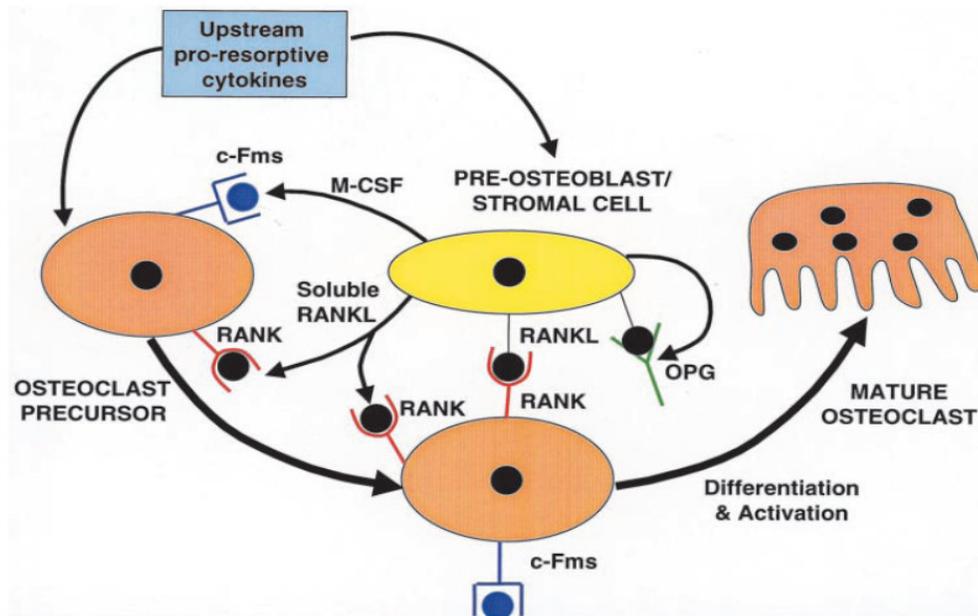
Além da sua função na osteoclastogênese, o RANKL também é encontrado nos tecidos linfóides . Ele é expresso por células T ativadas (Linfócitos T), bem como ativa as células dendríticas, sugerindo que essa molécula exerce um importante papel nos sistemas imunológico e esquelético (YASUDA et al., 1998; DOUGALL et al. 1999; KONG et al., 1999; STOLINA et al., 2003).

A interação entre RANK-RANKL é necessária para a diferenciação do sistema imune. Estudos têm demonstrado que ratos com deficiência de RANKL ou RANK apresentam prejuízo no desenvolvimento das células T e B, bem como o não desenvolvimento dos nodos linfóides periféricos, sendo RANKL um fator de diferenciação dos precursores das células B e T, além da ativação destas (DOUGALL et al., 1999; KONG et al., 1999).

Dois grupos de pesquisadores, em estudos independentes, identificaram uma proteína que bloqueava a osteoclastogênese, denominando-a de Osteoprotegerina ou OPG, isto é, proteína protetora do osso, tendo também como sinônimo Fator Inibidor da Osteoclastogênese (OCIF) (SIMONET et al., 1997; TSUDA et al., 1997). OPG é um receptor solúvel, membro da família do Receptor do Fator de Necrose Tumoral (TNFR), que pode ligar-se competitivamente ao RANKL, impedindo a interação entre o RANK e RANKL, bloqueando as funções do RANKL na osteoclastogênese, inibindo assim, a

formação dos osteoclastos e a reabsorção óssea (SIMONET et al., 1997; TSUDA et al., 1997; YASUDA et al., 1998; BURGESS et al., 1999; KARTSOGIANNIS et al., 1999; HUANG et al., 2000; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001; SCHOPPER; PREISSNER; HOFBAUER, 2002; BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003).

OPG é uma proteína solúvel produzida por diversos tecidos, incluindo tecido ósseo, pulmão, coração, fígado, rins, intestinos, estômago e glândula tireóide. Porém, até então, só está bem estabelecida a função desta proteína no tecido ósseo, permanecendo obscura sua função nestes outros tecidos (KHOSLA, 2001). OPG inibe o desenvolvimento dos osteoclastos, regulando a osteoclastogênese (TSUDA et al., 1997). OPG anula o efeito do RANKL, tanto ligado à membrana, como a forma solúvel (YASUDA et al., 1998; KHOSLA, 2001) (Figura 01).



**Figura 01.** Regulação da osteoclastogênese através das moléculas RANKL-RANK-OPG (Retirado e adaptado de Khosla, 2001).

Desequilíbrio entre a atividade dos osteoblastos e osteoclastos pode originar uma variedade de alterações ósseas, resultando em anormalidades esqueléticas caracterizadas pelo aumento da massa óssea (osteopetrose) ou diminuição do tecido ósseo (osteoporose) (KONG et al., 1999). Tem sido descrito que superexpressão de OPG bloqueia a maturação dos osteoclastos, levando ao desenvolvimento de osteopetrose em ratos, bem como a deleção de OPG resulta no aumento da remodelação óssea, induzindo o desenvolvimento de osteoporose (SIMONET et al., 1997; WAGNER; KARSENTY, 2001; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001; ANANDARAJAH, 2009).

A identificação do sistema RANK/RANKL/OPG como mediador final da osteoclastogênese representou um grande avanço no estudo da biologia óssea (KHOSLA, 2001). Tem sido proposto que a concentração de RANKL e OPG no meio ambiente ósseo pode determinar o potencial osteoclástico local (HUANG et al., 2000), pois a expressão de RANKL e OPG é coordenada para regular a reabsorção e densidade óssea, por controlar o estado de ativação dos osteoclastos (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; ANANDARAJAH, 2009). Assim, atualmente é reconhecido que pesquisas que envolvam reabsorção óssea, devam analisar o sistema RANK-RANKL-OPG (GALLAGHER, 2008), pois essas moléculas são fatores chaves na regulação do metabolismo ósseo (HUANG et al., 2000; CROTTI et al., 2003; TAY et al., 2004; ANANDARAJAH, 2009).

Alguns estudos foram realizados analisando estes fatores envolvidos na reabsorção óssea (RANKL, RANK e OPG) em diversas lesões odontogênicas e outros processos patológicos da cavidade oral (CROTTI et al., 2003; ITONAGA et al., 2003; LIU; YU; LI, 2003; KUMAMOTO e OOYA, 2004; TAY et al., 2004; TOBÓN-ARROYAVE et al., 2005; MENEZES et al., 2006; VERNAL et al., 2006; BOSTANCI et al., 2007; SILVA et al., 2008; ANDRADE et al., 2008).

Crotti et al. (2003) estudaram a expressão dos mediadores de reabsorção RANKL e OPG em tecido de granulação adjacente à perda óssea de pacientes com periodontite e observaram maior expressão do RANKL nos tecidos de pacientes com periodontite comparado aos tecidos sem essa doença, ao passo que

OPG foi significativamente menor. Frente a esses resultados, os autores concluíram que alterações nos níveis desses reguladores de diferenciação dos osteoclastos podem exercer um importante papel na perda óssea vista em pacientes com periodontite.

Tay et al. (2004) avaliaram a expressão de RANKL e TRAP em lesões osteolíticas dos maxilares, incluindo cistos dentígeros, radiculares, tumor odontogênico ceratocístico e ameloblastomas, detectando a expressão do RANKL em todos os casos da amostra. Esses pesquisadores sugeriram que citocinas inflamatórias produzidas pelas lesões osteolíticas causam a superexpressão de RANKL nos osteoblastos e células estromais, enaltecendo que a presença de RANKL é requerida para osteoclastogênese nessas lesões do complexo maxilofacial.

As expressões de RANKL e OPG foram analisadas por Kumamoto e Ooya (2004) em germes dentários e ameloblastomas, verificando maior expressão destas proteínas nas células mesenquimais que nas células epiteliais tumorais. Além disso, as células epiteliais dos ameloblastomas demonstraram menor expressão de RANKL e OPG comparadas às células dos germes dentários. Assim, os autores concluem que as expressões de RANKL, OPG e Proteína relacionada ao Paratormônio (PTHrP) podem agir localmente na regulação do metabolismo ósseo e no dinâmico processo de desenvolvimento dentário. Em ameloblastoma é provável que essas moléculas também possam estar envolvidas na diferenciação das células tumorais, bem como na destruição do tecido ósseo.

Menezes et al. (2006), estudaram a imunoexpressão de RANKL e OPG em granulomas e cistos periapicais, detectando uma razão de células RANKL positivas maior que as OPG positivas nos dois grupos analisados, sendo essas proteínas expressas nas células mononucleares CD68 positivas, bem como nas células epiteliais do revestimento cístico. Os autores concluíram que a presença dessas proteínas sugere fortemente o envolvimento do produto desses genes no desenvolvimento das lesões periapicais.

Vernal et al. (2006) analisaram o nível do RNAm de RANKL em granulomas periapicais e observaram uma maior expressão gênica de RANKL nos granulomas em comparação com tecido periodontal normal (ligamento periodontal), sugerindo que o RANKL está envolvido na perda óssea relacionada com as lesões periapicais. Nesse mesmo estudo, os autores determinaram por citometria de fluxo que os monócitos e as células dendríticas foram as principais células que sintetizaram RANKL nos granulomas. Então segundo esses autores, métodos que controlem a atividade de RANKL podem constituir, no futuro, ferramentas para o tratamento das lesões periapicais.

No estudo de Bostanci et al. (2007), realizado com indivíduos saudáveis e com doença periodontal (gingivite, periodontite crônica, periodontite agressiva generalizada e periodontite crônica associada a terapia imunossupressora), foram avaliados os níveis de RANKL e OPG no fluido crevicular por meio do teste ELISA (Ensaio Imunoenzimático). Os pesquisadores detectaram baixos níveis de RANKL e OPG no grupo de indivíduos saudáveis e com gingivite, mas houve um aumento de RANKL nas três formas de periodontites, sem diferença entre os grupos de periodontites crônica e agressiva. A razão RANKL/OPG foi significativamente mais elevada nos três grupos de periodontite comparados com o grupo de indivíduos saudáveis e com gingivite, assim, essa razão relativa similar nas três formas de periodontite, pode, portanto, predizer a ocorrência da doença.

Kawashima et al. (2007) analisaram a expressão do RNAm de RANK, RANKL, OPG, IL-1 e TNF por RT-PCR em lesões periapicais induzidas em ratos e observaram uma superexpressão de RANKL nos estágios de início e progressão da doença (com pico em 2-3 semanas). Concomitante a esse achado, a expressão das citocinas inflamatórias também aumentou nesse estágio, sugerindo o efeito sinérgico do RANKL e das citocinas proinflamatórias estudadas, sinalizando a progressão das lesões periapicais.

Comparando a expressão imuno-histoquímica do RANK, RANKL e OPG entre ameloblastoma, tumor odontogênico ceratocístico e cisto dentígero, Silva

et al. (2008) verificaram maior marcação dessas proteínas nos casos de ameloblastomas sólidos (75%) e unicísticos (62,5%), sendo o número de células RANKL positivas maior que OPG positivas. Esses resultados indicam que diferenças na expressão desses fatores podem contribuir para atividade diferenciada na reabsorção óssea e dentária entre as lesões estudadas.

Andrade et al. (2008) pesquisaram a expressão dos reguladores da reabsorção óssea em tumores odontogênicos e encontraram imunexpressão das proteínas RANK, RANKL e OPG em todos os espécimes da amostra analisada, tanto nas células epiteliais como estromais. A maioria dos casos de tumor odontogênico cístico calcificante e tumor odontogênico adenomatóide exibiu maior expressão de OPG que RANKL, ao passo que muitos dos casos de tumor odontogênico epitelial calcificante, fibroma ameloblástico e mixoma odontogênico demonstraram imunexpressão maior do RANKL que do seu inibidor. Os autores inferiram que as células constituintes dos tumores odontogênicos expressam os reguladores chaves do metabolismo ósseo e que essas podem modular localmente a destruição do tecido ósseo associada aos tumores.

Chuang et al. (2009) estudaram a expressão imuno-histoquímica de RANKL, RANK e OPG em Carcinoma de Células Escamosas orais (CEC) e observaram a imunexpressão dessas proteínas nos casos de CEC com e sem invasão óssea, exibindo marcação diferente do epitélio da mucosa oral normal, pois este não demonstrava expressão de RANK. Diante desses resultados, especula-se que durante a carcinogênese oral ocorre uma superexpressão de RANK, sugerindo o valor potencial das moléculas RANK/RANKL/OPG como biomarcadores do câncer oral.

### **2.2.2 Fatores de reabsorção em lesões de células gigantes**

Fatores de reabsorção óssea têm sido estudados em vários tumores osteolíticos que contêm células gigantes (HUANG et al., 2000; ATKINS et al., 2000; ATKINS et al., 2001; LIU; YU; LI, 2003; ITONAGA et al., 2003;

MORGAN et al., 2005, TOBÓN-ARRAYAVE et al., 2005; ANANDARAJAH, 2009).

Huang et al. (2000) analisaram os níveis de RNAm de OPG, RANK e RANKL por hibridização *in situ* e RT-PCR em Tumores de Células Gigantes (TCG) dos ossos longos e detectaram que RNAm OPG foi expresso amplamente nos três tipos celulares que compõem essas lesões, sendo os transcritos de RANK detectados nas células mononucleares ovóides e nas células gigantes, enquanto que RANKL foi observado principalmente nas células mononucleares de morfologia fusiforme e ausente nas células gigantes. Além disso, nesse estudo, os autores evidenciaram uma proporção de RANKL/OPG maior nos tumores estudados que no tecido ósseo normal.

Atkins et al. (2000) detectaram que as células dos TCG dos ossos longos exibiam uma maior proporção de RANKL que OPG quando comparados com outros tumores osteolíticos dos ossos, inclusive osteblastoma e sarcoma osteogênico esclerótico.

Atkins et al. (2001) estudaram a expressão do RNAm de RANKL, OPG e RANK em TCG dos ossos longos, no qual observaram a expressão de RANKL no citoplasma e membrana plasmática das células mononucleadas, enquanto RNAm de OPG foi detectado nas células mononucleadas e multinucleadas, ao passo que RANK foi evidenciado apenas no componente celular multinuclear. Esses dados indicam que os processos de formação e ativação dos osteoclastos nos TCG são promovidos via sistema RANKL.

Itonaga et al. (2003) analisaram o fenótipo das células gigantes multinucleadas, bem como a expressão de RANKL e OPG em LCCG, observando imunopositividade para RANKL nas células mononucleares estromais e que OPG inibiu marcadamente a formação das células gigantes multinucleadas, bem como a reabsorção óssea. Com esses achados, os autores inferiram que as células gigantes presentes nessas lesões são osteoclastos-*like*, originadas de precursores monocítico-macrofágicos, os quais se diferenciam em osteoclastos sob influência

das células mononucleares lesionais expressando RANKL, sendo assim responsáveis pela osteólise nesses tumores.

Li, Yu e Li (2003), analisaram a expressão do RNAm de RANKL, RANK e OPG em lesões contendo células gigantes multinucleadas (LCCG, LPCG, Querubismo e cisto ósseo aneurismático), encontrando positividade para o RANKL, principalmente nas células mononucleares fusiformes e ausência nas células gigantes multinucleadas, enquanto RANK foi observado nas células mononucleares ovóides e nas células gigantes. Com relação à OPG, todos os tipos celulares estudados foram positivos. Os autores sugeriram que o mecanismo pelo quais as células multinucleadas induzem a reabsorção óssea nessas lesões ocorre devido à ligação RANK/RANKL, semelhante à osteoclastogênese normal, nas quais as células multinucleadas expressam características fenotípicas de osteoclastos e que RANKL/OPG exercem importante papel na formação das CG em todas essas lesões.

Tobón-Arroyave et al. (2005) avaliaram a expressão do RANK, receptor para calcitonina (CTR) e receptor para glicocorticóide (GR) em LCCG agressivas e não-agressivas, mostrando marcação de intensidade moderada a forte para RANK nas células multinucleadas e mononucleadas de formato ovóide. As células estromais fusiformes não exibiram imunorretividade para tal marcador, e não se observou diferença na expressão desse marcador entre as formas clínicas das LCCG. Nesse trabalho, os autores sugeriram que o mecanismo pelo quais as células mononucleadas e CG induzem a reabsorção óssea é similar ao encontrado na osteoclastogênese do tecido ósseo normal, através da ligação RANK/RANKL. Assim, qualquer agente terapêutico que iniba a interação entre essas moléculas, como OPG, pode ser utilizado no tratamento das lesões centrais de células gigantes.

Houpis et al. (2009) analisaram a expressão de peptídeo relacionado ao Paratormônio (PTHrP) e seu receptor, designado Receptor do Paratormônio do tipo 1 (PTHr1) entre casos de LCCG e LPCG, demonstrando que nessas lesões, células PTHrP positivas ativam osteoblastos PTHr1 para produzirem RANKL,

que, por sua vez, interage com RANK, induzindo a osteoclastogênese através da via clássica RANK/RANKL.

Pesquisas têm sido desenvolvidas no intuito de melhor compreender o comportamento biológico das lesões osteolíticas, propiciando diversas possibilidades terapêuticas para essas lesões (ANANDARAJAH, 2009). Caracterização do perfil molecular das células nos TCG tem demonstrado positividade para os fatores de reabsorção óssea RANK/RANKL/OPG nas células tumorais, inclusive expressão de RANKL nas células gigantes multinucleadas. Aponta-se que essas moléculas podem ser alvos terapêuticos para o tratamento dessa patologia (MORGAN et al., 2005).

Apesar da semelhança histológica, as LCCG e as LPCG apresentam comportamento clínico diferente. Até então, não há nenhum trabalho descrito na literatura comparando a expressão imuno-histoquímica dos marcadores de reabsorção óssea entre essas lesões. Se esse comportamento biológico diferenciado é influenciado por esses fatores, ainda não está completamente elucidado.



### **3 PROPOSIÇÃO**

O propósito desse estudo foi comparar a expressão imuno-histoquímica dos marcadores de reabsorção óssea (RANK, RANKL e OPG) entre lesões centrais e periféricas de células gigantes, com o intuito de fornecer subsídios para melhor compreensão do diferente comportamento biológico dessas entidades patológicas, bem como entre as diferentes formas de apresentação clínica das LCCG.



## **4 MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1 IMPLICAÇÕES ÉTICAS:**

A presente pesquisa foi submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e obteve o parecer favorável sob o número: 188/2008, constante no anexo 1.

### **4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO**

O presente estudo consistiu de uma avaliação morfológica descritiva, bem como análise comparativa por intermédio de estudo imuno-histoquímico da expressão das proteínas de reabsorção óssea (RANK, RANKL e OPG) entre casos de LCCG e LPCG.

### **4.3 POPULAÇÃO**

A população alvo foi constituída por todos os casos de LCCG e LPCG emblocados em parafina obtidos dos arquivos dos Laboratórios de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), durante o período de janeiro de 2000 a junho de 2008.

### **4.4 AMOSTRA**

Para o presente trabalho foram selecionados 31 casos de LCCG e 30 casos de LPCG dos laboratórios de anatomia patológica supracitados.

De acordo com as suas características clínicas, os casos de LCCG foram classificados em agressivos e não-agressivos, conforme os critérios descritos por Chuong et al. (1986). Esses critérios consistiam em: Sintomatologia dolorosa, taxa de crescimento, reabsorção radicular, perfuração cortical óssea e história de recorrência.

## 4.5 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DA AMOSTRA

### 4.5.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo espécimes que tenham sido diagnosticados histopatologicamente como Lesão Central de Células Gigantes e Lesão Periférica de Células Gigantes, bem como contendo quantidade suficiente de material disponível nos blocos de parafina para análise, independente do tipo de biópsia (incisional ou excisional). Os casos selecionados deveriam apresentar as fichas clínicas devidamente preenchidas para anotação dos dados clínicos de interesse para realização do estudo (Sexo, idade, localização da lesão, sintomatologia, tempo de evolução, tamanho da lesão e dados radiográficos).

### 4.5.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos da amostra os casos que apresentavam quantidade insuficiente de material, tanto para estudo morfológico como para análise imuno-histoquímica, bem como os casos que não continham os seus respectivos prontuários completos. Além disso, para os casos de LCCG foram excluídos os casos de pacientes com hiperparatireoidismo, por investigação sorológica dos níveis de hormônio paratireoideano (PTH), bem como os casos com terapêutica medicamentosa prévia.

## 4.6 ESTUDO MORFOLÓGICO

Os espécimes referentes aos casos foram submetidos a cortes histológicos de 5µm de espessura, corados pela técnica da Hematoxilina/Eosina(H/E) e analisados à microscopia de luz. A observação das diversas características microscópicas foi descritiva.

#### 4.7 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Os espécimes fixados em formol a 10% e posteriormente emblocados em parafina foram submetidos a cortes de 3 µm de espessura e montados em lâminas de vidro previamente preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropyltriethoxi-silano, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA). Os cortes foram submetidos aos anticorpos anti-RANK, anti-RANKL e anti-OPG. A técnica imuno-histoquímica empregada foi a da estreptoavidina-biotina (LSAB *Labeled streptavidin biotin*; Dako, Glostrup, Dinamarca). Essa consistiu nos seguintes passos:

- Xilol 1 (30 minutos) - 59°C
- Xilol 2 (20 minutos) – Temperatura Ambiente (TA)
- Álcool absoluto I – 5 minutos – TA
- Álcool absoluto II – 5 minutos – TA
- Álcool absoluto III – 5 minutos – TA
- Álcool 95° GL – 5 minutos – TA
- Álcool 80° GL – 5 minutos – TA
- Hidróxido de amônia em etanol 95° GL (10 minutos) – TA
- Lavagem em água corrente - 10 minutos
- Água destilada (02 passagens) – 05 minutos cada
- Peróxido de hidrogênio a 10 volumes (02 passagens) – 15 minutos cada
- Água corrente – 10 minutos
- Água destilada (02 passagens) – 05 minutos cada
- Incubação em TRIS-HCL, pH 7,4 (tris-hidroximetil-aminometano, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) (02 passagens) – 05 minutos cada
- Recuperação antigênica: Citrato pH6 por 10 minutos na panela Pascal

- Incubação dos anticorpos primários: Anti-RANK, anti-RANKL e anti-OPG conforme a otimização da técnica (Quadro 1)
- Lavagem em TRIS-HCL, pH 7,4.
- Incubação em TRIS-HCL, pH 7,4 (02 passagens – 05 minutos cada).
- Incubação do anticorpo secundário Biotinylated link (Kit Santa Cruz Cytomation LSAB+ System-HRP) durante 30 minutos
- Lavagem TRIS-HCL, pH 7,4
- Incubação TRIS-HCL, pH 7,4 (02 passagens – 05 minutos cada).
- Incubação do complexo estreptoavidina HRP (Kit DAKO Cytomation LSAB+ System-HRP) durante 30 minutos - TA
- Lavagem TRIS-HCL, pH 7,4.
- Incubação TRIS-HCL, pH 7,4 (02 passagens – 05 minutos cada).
- Incubação em solução cromógena preparada em 25 a 30 mg de diaminobenzidina (93,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) diluída em 100 ml de TRIS-HCL, acrescida de 1,2 ml de peróxido de hidrogênio a 10 volumes, durante 03 minutos em câmara escura.
- Água corrente – 10 minutos
- Água destilada (02 passagens) – 05 minutos cada
- Contracoloração com hematoxilina de Mayer – 10 minutos -TA
- Água corrente – 10 minutos
- Água destilada (02 passagens) – 05 minutos cada
- Desidratação
- Diafanização
- Montagem da lamínula em resina Permount® (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

**Quadro 1**– Clone, especificidade, diluição, tratamento de recuperação e tempo de incubação dos anticorpos utilizados.

Clone	Especificidade	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
C-20 (sc-7625)*	RANK	1:200	Citrato pH6,0- Pascal por 10 minutos	Overnight
N-19(sc-7628)*	RANKL	1:200	Citrato pH6,0- Pascal por 10 minutos	Overnight
N-20(sc-8468)*	OPG	1:200	Citrato pH6,0- Pascal por 10 minutos	Overnight

\* Santa Cruz Biotechnology

#### 4.8 ANÁLISE DA MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foi feita análise quantitativa da marcação imuno-histoquímica dos anticorpos em todos os espécimes incluídos na amostra. O parâmetro consistiu na positividade da marcação, sendo consideradas positivas as células que exibiram coloração acastanhada no citoplasma, independente da intensidade. Verificada a imunomarcação, calculou-se as médias de marcação dos anticorpos em estudo.

Para a análise das proteínas RANK, RANKL e OPG, sob aumento total de 400x, foram capturadas imagens em 10 campos de cada um dos casos, por meio de máquina fotográfica digital OLYMPUS E-330 (Olympus Corporation- Tokyo, Japan), acoplada ao microscópio OLYMPUS CX41 Olympus Corporation- Tokyo, Japan). As imagens obtidas foram analisadas, por meio do programa Image J (*Image and Processing Analysis in Java*- Rasband, W.S., ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2004), por um único observador, em momentos distintos.

A análise da expressão das proteínas RANK, RANKL e OPG foi feita por meio de contagem das células imunomarcadas, nos 10 campos fotografados, levando-se em consideração, separadamente, as células mononucleadas e multinucleadas (Adaptado de Liu; Yu; Li, 2003). Em posse desses dados, foram obtidos os números médios de células mononucleadas e multinucleadas

imunomarcadas, bem como o total de células positivas, para cada caso (Apêndices 1, 2 e 3).

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram utilizados para construção do banco de dados em uma planilha de Excel, os quais foram posteriormente transferidos para software SPSS 17.0 para ambiente Windows, que foram submetidos a testes estatísticos adequados, a fim de testar as hipóteses levantadas.

O teste de Mann-Whitney foi empregado para verificar a existência de diferença entre a expressão dos fatores de reabsorção óssea RANK, RANKL e OPG para cada tipo celular entre as LCCG e LPCG, bem como a diferença na expressão desses marcadores e o tamanho das lesões (categorizados conforme a mediana). Para avaliar a associação entre a proporção RANKL/OPG entre os casos de LPCG e LCCG, empregou-se o teste qui-quadrado. Já para a análise da imunoexpressão dos marcadores e as LPCG e LCCG, conforme sua agressividade empregou-se os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

No sentido de verificar a existência de correlação entre a expressão dos marcadores RANK, RANKL e OPG entre si e com o tamanho das lesões, optou-se pela realização do coeficiente de correlação de Spearman.

Todos os testes foram realizados tomando como base o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

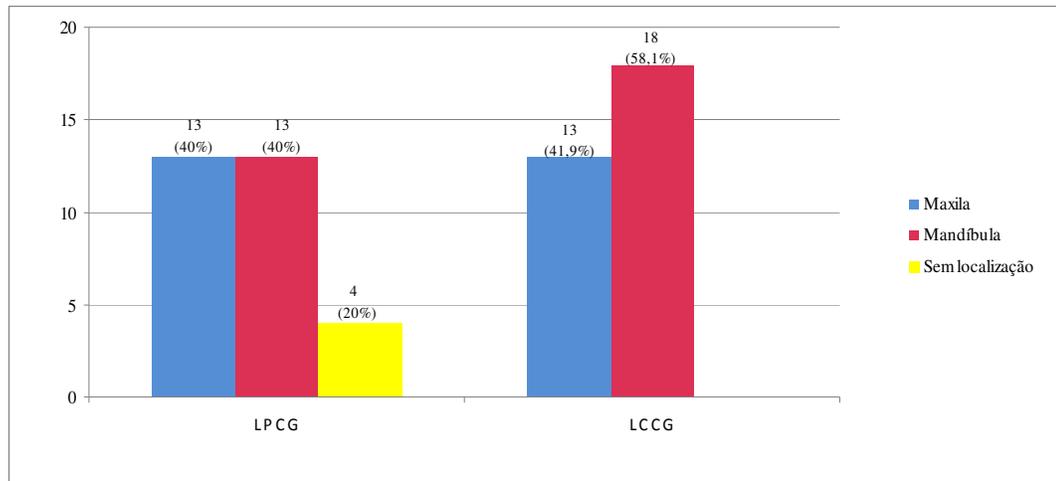


## 5 RESULTADOS

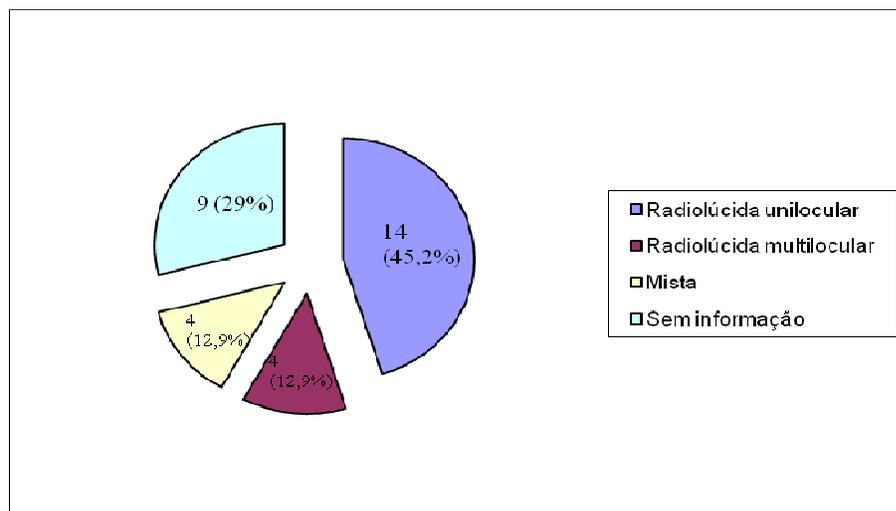
### 5.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL DA AMOSTA

Da amostra analisada, as Lesões Periféricas de Células Gigantes provieram de pacientes com idade média de  $37,93 \pm 19,10$  anos, tendo como idade mínima 05 anos e máxima, 70 anos. Nesse tipo de lesão, houve uma discreta predominância em pacientes do sexo masculino com 16 casos (53,3%), sendo a maioria das lesões assintomáticas, perfazendo 70% dos casos. Quanto à localização, ambos os maxilares foram equivalentemente acometidos (13 casos em cada) (Figura 02), sendo a região anterior com 14 casos (46,7%) mais prevalente que a região posterior com 07 casos (23,3%). Em 09 casos (30%), a região da lesão não foi informada, em virtude do preenchimento inadequado das fichas clínicas. Radiograficamente, 23 casos de LPCG não exibiam imagem radiográfica (76,7%) e 07 casos (23,3%) demonstraram uma rarefação óssea superficial. O tamanho médio das LPCG foi de  $2,05 \pm 1,08$  cm, com o tamanho mínimo de 0,5 cm e máximo de 5 cm.

Com relação às Lesões Centrais de Células Gigantes, a média de idade dos pacientes desse grupo de lesão foi de  $23,29 \pm 13,35$ , tendo como idade mínima 05 anos e máxima, 58 anos. Quanto ao sexo, 17 casos provieram de pacientes do sexo feminino (54,8%) e 14 do sexo masculino (45,2%), apresentando como principal sítio de acometimento a mandíbula (58,1%) (Figura 02) e havendo predileção pela região posterior com 14 casos (45,2%) em relação à anterior (09 casos- 29%), apresentando 08 casos sem informação correspondente à localização (25,8%). Quanto à sintomatologia dolorosa, 13 casos foram assintomáticos (41,9%), enquanto 10 casos (32,3%) apresentaram sintomatologia dolorosa e 08 casos não faziam referência à presença de dor (25,8%). Os dados radiográficos demonstraram que houve maior frequência de lesão radiolúcida unilocular com 14 casos (45,2%) (Figura 03). As LCCG tiveram como tamanho médio  $3,55 \pm 3,63$  cm, tendo como tamanho mínimo 0,5 cm e 8 cm, o máximo.



**Figura 02.** Distribuição dos casos de Lesão de células gigantes de acordo com a localização das lesões. Natal/ RN, 2010.

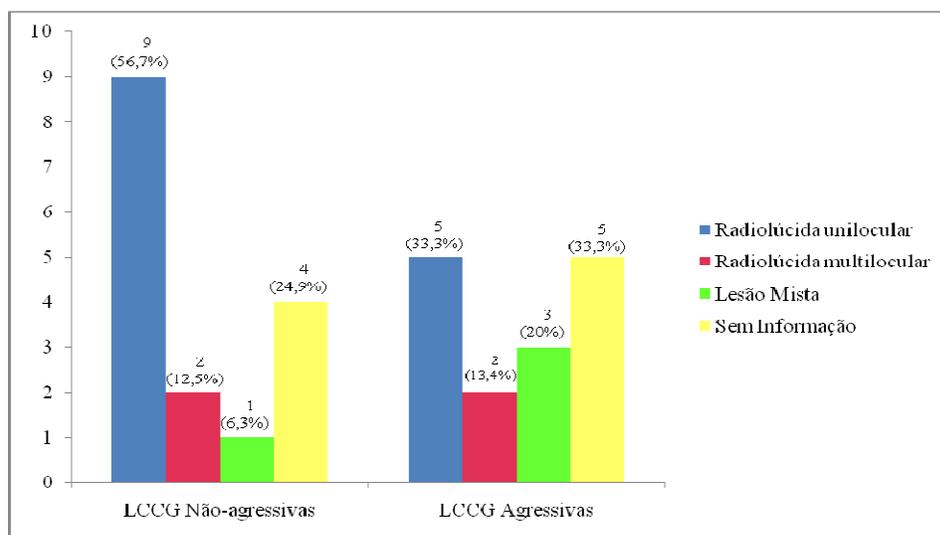


**Figura 03.** Distribuição dos casos de Lesões centrais de células gigantes segundo a imagem radiográfica. Natal/ RN, 2010.

Dos 16 casos de LCCG não-agressivas, a média de idade nesse grupo foi de  $25,87 \pm 15,33$ , tendo como idade mínima e máxima de 7 anos e 58 anos, respectivamente, distribuídos igualmente entre os sexos feminino e masculino (08 casos para cada). No que se refere ao sítio anatômico, 10 casos acometeram a mandíbula (62,5%) e 06 a maxila (37,5%), localizando-se 08 casos na região posterior (50%), 05 na região anterior (31,3%) e 03 sem descrição da localização anatômica (18,8%). Quanto à sintomatologia, 50% eram assintomáticos, com 02

casos sintomáticos (12,5%) e 06 (37,5%) sem descrição de sintomatologia dolorosa. O aspecto radiográfico predominante foi de lesão radiolúcida unilocular com 09 casos (56,3%), 12,5% com radiolucidez multilocular, equivalente a 02 casos e 01 caso (6,3%) exibindo lesão radiolúcida com focos radiopacos (mista) (Figura 04). O tamanho médio das lesões nesse grupo foi de  $3,78 \pm 2,11$  cm, com o tamanho mínimo de 0,5 cm e máximo de 8 cm. Ressalta-se que o maior tamanho das LCCG foi evidenciado nesse grupo, pois a classificação de Chung et al.(1986) não baseia-se no tamanho da lesão.

No grupo das LCCG classificadas como agressivas, a idade média foi de  $20,53 \pm 10,68$ , tendo como idade mínima 05 anos e máxima, 42 anos, com predomínio dos casos no sexo feminino (60%). Quanto à localização, houve uma discreta predileção pela mandíbula, com 08 casos (53,3%) em relação à maxila (46,7%), sendo 06 casos localizados na região posterior, 04 na região anterior (26,7%) e 05 sem descrição. Radiograficamente, 05 casos revelavam uma lesão radiolúcida unilocular (33,3%), 02 lesões multiloculares (13,4%), 03 lesões radiolúcidas com focos radiopacos (mistas)(20%) e em 5 casos não haviam informações radiográficas (Figura 04). As lesões de células gigantes agressivas tiveram como tamanho médio  $3,27 \pm 1,65$  cm, tendo como mínimo de 2 cm e o tamanho máximo de 7cm.



**Figura 04.** Distribuição dos casos das Lesões centrais de células gigantes não-agressivas e agressivas de acordo com a imagem radiográfica. Natal/ RN, 2010.

Nesse estudo, observamos histologicamente, pela análise microscópica dos cortes corados em H/E, que as lesões exibiam uma proliferação de células com morfologia ora fusiformes ora ovóides, entremeadas com células gigantes multinucleadas de tamanho diverso e com quantidade variada de núcleos. O número e a localização das células gigantes variavam dentro de cada lesão e de lesão para lesão. O tecido conjuntivo era do tipo fibroso, moderadamente vascularizado, e em muitos dos casos observou-se hemácias extravasadas com pigmentação por hemossiderina. Nos espécimes de LPCG observou-se epitélio de revestimento de mucosa oral e completando o quadro histopatológico em alguns casos verificou-se um leve infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear. Tecido ósseo adjacente também foi evidenciado em alguns espécimes de LCCG. (Figuras 05 e 06).

## 5.2 RESULTADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

A marcação imuno-histoquímica dos anticorpos anti-RANK, anti-RANKL, anti-OPG foi evidenciada ao microscópio de luz pela coloração acastanhada, que variava do castanho claro ao marrom, no citoplasma e/ou na membrana plasmática das células, tanto nas células mononucleadas quanto nas células gigantes multinucleadas (CG). Em relação aos componentes celulares, foi verificada imunomarcação em todos os casos da presente amostra nas células mononucleadas, ao passo que em alguns casos, não foi evidenciado positividade nas CG, principalmente para o marcador RANKL (Figuras 07, 08, 09, 10, 11 e 12). Além das células supracitadas, observou-se positividade em células com morfologia semelhante a linfócitos e células endoteliais.

Para os espécimes de LPCG, a avaliação da quantidade total de células positivas para o anticorpo anti-RANK revelou uma média de  $21,33 \pm 13,80$  células. Por sua vez, a análise da quantidade total de células imunorreativas aos anticorpos anti-RANKL e anti-OPG demonstrou uma média de  $10,23 \pm 5,53$  e  $10,26 \pm 7,19$ , respectivamente.

Quanto aos casos de LCCG, em média, para o anticorpo anti-RANK, 21,18±17,84 células totais foram imunomarcadas, sendo para o anti-RANKL, 17,09±11,26 células e para anti-OPG a quantidade média de células positivas foi de 7,66±6,40 células. Nas LCCG agressivas, as médias de células totais imunomarcadas para RANK, RANKL e OPG foram 23,65±19,49, 17,87±13,79 e 8,58±7,16, respectivamente. E nas LCCG não-agressivas as médias de células totais imunorreativas para o RANK foram 18,87±16,40, sendo respectivamente 16,81±8,72 e 6,80±5,71 para os marcadores RANKL e OPG.

A quantidade média de células imunomarcadas para cada anticorpo, conforme o tipo celular MO ou CG, pode ser evidenciada nas tabelas 01 e 02.

**Tabela 01.** Valores de médias e desvio padrão da quantidade de células marcadas em cada anticorpo, conforme o tipo celular e lesão. Natal/RN, 2010.

<b>Marcador -Tipo celular</b>	<b>LPCG</b>	<b>LCCG</b>
<b>RANK – MO</b>	19,62±13,73	19,49±17,63
<b>RANK – CG</b>	1,71±1,50	1,69±1,71
<b>RANKL – MO</b>	9,46±4,71	16,33±10,91
<b>RANKL – CG</b>	1,00±1,07	1,08±0,97
<b>OPG – MO</b>	8,37±6,32	6,59±6,23
<b>OPG – CG</b>	1,89±2,08	1,11±1,00

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral. Natal/RN

LPCG - Lesão Periférica de Células Gigantes, LCCG- Lesão Central de Células Gigantes, MO- Células Mononucleadas, CG- Células Gigantes Multinucleadas

**Tabela 02.** Valores de médias e desvio padrão da quantidade de células marcadas em cada anticorpo nas lesões de células gigantes, conforme o tipo celular e agressividade. Natal/RN, 2010.

<b>Marcador - Tipo celular</b>	<b>LCCG Não-Agressivas</b>	<b>LCCG Agressivas</b>
<b>RANK – MO</b>	17,18±16,16	21,96±19,33
<b>RANK – CG</b>	1,69±1,45	1,69±2,00
<b>RANKL – MO</b>	16,53±8,55	16,12±13,30
<b>RANKL – CG</b>	0,91±0,71	1,26±1,19
<b>OPG – MO</b>	5,56±5,42	7,70±7,01
<b>OPG – CG</b>	1,26±1,04	0,94±0,97

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral. Natal/RN

LPCG - Lesão Periférica de Células Gigantes, LCCG- Lesão Central de Células Gigantes, MO- Células Mononucleadas, CG- Células Gigantes Multinucleadas

### 5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A tabela 03 expressa os valores de mediana, quartis 25 e 75, e parâmetros estatísticos para a quantidade de células mononucleadas, células gigantes multinucleadas e células totais marcadas pelos anticorpos anti-RANK, anti-RANKL e anti-OPG entre os casos de lesões centrais e periféricas de células gigantes.

**Tabela 03.** Tamanho da amostra, medianas, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para a quantidade de células marcadas de cada anticorpo em relação ao tipo de lesão. Natal/ RN, 2010.

Marcador/ Tipo celular	Lesão	n	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	Soma dos postos	U	p
<b>RANK MO</b>	LCCG	31	12,50	8,50-27,50	29,47	913,50	417,500	0,493*
	LPCG	30	15,10	11,20-25,12	32,58	977,50		
<b>RANK CG</b>	LCCG	31	1,20	0,30-2,70	30,37	941,50	445,500	0,778*
	LPCG	30	1,60	0,37-2,60	31,65	949,50		
<b>RANK total</b>	LCCG	31	15,60	10,10- 30,10	29,40	911,50	415,500	0,475*
	LPCG	30	17,35	13,35-25,57	32,65	979,50		
<b>RANKL MO</b>	LCCG	31	14,80	9,20-18,60	37,94	1176,00	250,000	<b>0,002*</b>
	LPCG	30	8,85	5,70-13,57	23,83	715,00		
<b>RANKL CG</b>	LCCG	31	0,80	0,30-1,70	31,94	990,00	436,000	0,674*
	LPCG	30	0,75	0,32-1,27	30,03	901,00		
<b>RANKL total</b>	LCCG	31	13,50	10,00-19,20	37,68	1168,00	258,000	<b>0,003*</b>
	LPCG	30	9,75	5,55-15,25	24,10	723,00		
<b>OPG MO</b>	LCCG	31	3,90	2,30-6,70	28,16	873,00	377,000	0,204*
	LPCG	30	6,00	3,40-12,65	33,93	1018,00		
<b>OPG CG</b>	LCCG	31	0,80	0,30-1,80	28,94	897,00	401,000	0,355*
	LPCG	30	1,35	0,10-2,65	33,13	994,00		
<b>OPG total</b>	LCCG	31	5,20	3,20-9,80	28,21	874,50	378,500	0,212*
	LPCG	30	9,60	3,77-17,00	33,88	1016,50		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral / UFRN

LCCG-Lesão Central de Células Gigantes, LPCG- Lesão Periférica de Células Gigantes,  
MO- Célula Mononucleada, CG- Célula Gigante Multinucleada

\* Teste de Mann-Whitney

Houve diferença estatística altamente significativa apenas na expressão do marcador RANKL nas células mononucleadas ( $p=0,002$ ) e células totais ( $p=0,003$ ), entre os casos de lesões centrais e periféricas de células gigantes.

Conforme a quantidade total de células imunomarcadas, para cada anticorpo foi realizada uma proporção entre RANKL e OPG, sendo os casos categorizados em: RANKL>OPG, OPG>RANKL e RANKL=OPG. (Tabela 04).

**Tabela 04.** Tamanho da amostra e porcentagem da proporção RANKL/OPG em relação ao tipo de lesão. Natal/ RN, 2010.

Tipo de lesão	Proporção RANKL/OPG				<i>p</i>
	RANKL>OPG n (%)	OPG>RANKL n (%)	OPG=RANKL n (%)	TOTAL n (%)	
<b>Lesão Central</b>	27 (87%)	2 (6,5%)	2 (6,5%)	31 (100%)	<b>0,001*</b>
<b>Lesão Periférica</b>	12 (40%)	12 (40%)	6 (20%)	30 (100%)	
<b>TOTAL</b>	39 (63,9%)	14 (23%)	8 (13,1%)	61 (100%)	

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral / UFRN

\* Teste Qui-quadrado

Evidenciou-se uma associação com grande significância estatística ( $p=0,001$ ) na proporção de RANKL maior que OPG nas LCCG, ao passo que no grupo das LPCG constatou-se uma distribuição similar entre casos com proporção RANKL>OPG e casos com proporção OPG>RANKL.

A verificação de uma possível diferença entre a quantidade de células marcadas pelos anticorpos anti-RANK, anti RANKL e anti-OPG, com relação ao tamanho das lesões, também foi investigada após categorização dos dados referentes ao tamanho em lesões pequenas ( $\leq 2,5\text{cm}$ ) e grandes ( $>2,5\text{cm}$ ), a partir da mediana (Tabela 05).

**Tabela 05.** Tamanho da amostra, medianas, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para cada anticorpo e tipo celular, em relação ao tamanho das lesões categorizado nas lesões de células gigantes. Natal/ RN, 2010.

Marcador/ Tipo celular	Tamanho das lesões	n	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	Soma dos postos	U	p
<b>RANK MO</b>	Lesões pequenas	35	15,70	10,40-28,80	31,84	1114,50	355,500	0,320*
	Lesões grandes	24	13,95	9,00-22,70	27,31	655,50		
<b>RANK CG</b>	Lesões pequenas	35	1,20	0,50-2,60	29,44	1030	400,500	0,763*
	Lesões grandes	24	1,45	0,325-3,325	30,81	739,50		
<b>RANK total</b>	Lesões pequenas	35	18,30	11,70-29,40	32,11	1124,00	346,000	0,253*
	Lesões grandes	24	15,40	10,97-22,75	26,92	646,00		
<b>RANKL MO</b>	Lesões pequenas	35	10,60	6,80-1,50	28,66	1003	373,000	0,468*
	Lesões grandes	24	11,25	8,12-1,40	31,96	767,00		
<b>RANKL CG</b>	Lesões pequenas	35	1,00	0,50-1,50	32,07	1122,50	347,500	0,261*
	Lesões grandes	24	0,70	0,001,40	26,98	647,50		
<b>RANKL total</b>	Lesões pequenas	35	11,70	7,40-17,70	28,63	1002,00	372,000	0,459*
	Lesões grandes	24	12,30	8,12-19,12	32,00	768,00		
<b>OPG MO</b>	Lesões pequenas	35	6,60	4,40-11,90	34,90	1221,50	248,500	<b>0,008*</b>
	Lesões grandes	24	3,60	1,95-5,27	22,85	548,50		
<b>OPG CG</b>	Lesões pequenas	35	1,30	0,30-2,50	32,21	1127,50	342,500	0,231*
	Lesões grandes	24	0,80	0,20-1,67	26,77	642,50		
<b>OPG total</b>	Lesões pequenas	35	9,30	4,40-17,60	34,31	1201,00	269,000	<b>0,020*</b>
	Lesões grandes	24	4,20	2,90-10,20	23,71	559,00		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral / UFRN

MO- Célula Mononucleada, CG- Célula Gigante Multinucleada

\* Teste de Mann-Whitney

Houve diferença significativa na expressão da proteína OPG nas células mononucleadas e células totais em relação ao tamanho, indicando que as lesões pequenas expressaram maior número de células OPG positivas.

A análise foi pormenorizada para cada grupo de lesão (LCCG e LPCG), avaliando a expressão dos marcadores RANK, RANKL e OPG nos tipos celulares mononucleadas e multinucleadas, bem como a agressividade no grupo das lesões centrais.

Na tabela 06 demonstra-se a análise da expressão das proteínas RANK, RANKL e OPG entre os grupos de lesões, sendo as LCCG subdivididas em agressivas e não-agressivas (conforme a agressividade).

**Tabela 06.** Tamanho da amostra, medianas, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística KW e significância estatística para a quantidade de células marcadas de cada anticorpo, em relação às lesões não-agressivas, agressivas e periféricas de células gigantes. Natal/ RN, 2010.

Marcador/ Tipo celular	Lesão	N	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	KW	p
<b>RANK MO</b>	LC Não-agressivas	16	11,65	6,45-24,62	27,50	0,876	0,645*
	LC Agressivas	15	14,30	8,50-29,30	31,57		
	LPCG	30	15,10	11,20-25,12	32,58		
<b>RANK CG</b>	LC Não-agressivas	16	1,30	0,52-2,70	32,22	0,439	0,803*
	LC Agressivas	15	0,90	0,00-3,10	28,40		
	LPCG	30	1,60	0,37-2,60	31,65		
<b>RANK total</b>	LC Não-agressivas	16	15,15	7,02 -27,50	27,94	0,736	0,692*
	LC Agressivas	15	15,60	10,10-31,00	30,97		
	LPCG	30	17,35	13,35-25,57	32,65		
<b>RANKL MO</b>	LC Não-agressivas	16	16,15	10,62-19,77	40,56	10,347	<b>0,006*</b>
	LC Agressivas	15	12,80	7,90-18,60	35,13		
	LPCG	30	8,85	5,70-13,57	23,83		
<b>RANKL CG</b>	LC Não-agressivas	16	0,80	0,17-1,57	30,97	0,276	0,871*
	Agressivas	15	0,80	0,30-2,40	32,97		
	LPCG	30	0,75	0,32-1,27	30,03		
<b>RANKL total</b>	LC Não-agressivas	16	15,00	11,47-19,65	39,22	9,169	<b>0,010*</b>
	LC Agressivas	15	13,10	8,40-19,20	36,03		
	LPCG	30	9,75	5,55-15,25	24,10		
<b>OPG MO</b>	LC Não-agressivas	16	3,55	1,90-6,67	24,53	2,996	0,224*
	LC Agressivas	15	4,30	3,60-7,90	32,03		
	LPCG	30	6,00	3,40-12,65	33,93		
<b>OPG CG</b>	LC Não-agressivas	16	0,95	0,62-1,57	31,78	1,710	0,425*
	LC Agressivas	15	0,50	0,30-1,80	25,90		
	LPCG	30	1,35	0,10-2,65	33,13		
<b>OPG total</b>	LC Não-agressivas	16	4,55	2,90-10,35	25,44	2,364	0,307*
	Agressivas	15	6,00	3,80-9,80	31,17		
	LPCG	30	9,60	3,77-17,00	33,88		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral / UFRN  
 LC- Lesão Central, LPCG- Lesão Periférica de Células Gigantes, MO- Célula Mononucleada,  
 CG- Célula Gigante Multinucleada  
 \* Teste de Kruskal-Wallis

Foram analisadas possíveis diferenças na quantidade de células positivas para os anticorpos anti-RANK, anti-RANKL e anti-OPG entre LPCG, LCCG agressivas e LCCG não-agressivas. O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis revelou diferença estatística altamente significativa na quantidade de células mononucleadas ( $p=0,006$ ) e de células totais ( $p=0,010$ ) positivas para RANKL, as quais se apresentaram inferiores nas LPCGs.

Com o intuito de verificar se havia diferença na expressão dos fatores de reabsorção óssea no grupo de LCCG, foi comparada a expressão desses fatores com relação à agressividade nas LCCG, visualizado na tabela 07.

**Tabela 07.** Tamanho da amostra, medianas, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e sua significância estatística para os anticorpos RANK, RANKL e OPG, conforme o tipo celular em relação à agressividade nas lesões centrais de células gigantes. Natal/ RN, 2010.

Marcador/ Tipo celular	Agressividade	n	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	Soma dos postos	U	p
<b>RANK MO</b>	Não-agressiva	16	11,65	6,45 -24,62	15,06	241,00	105,000	0,553*
	Agressiva	15	14,30	8,50 -29,30	17,00	255,00		
<b>RANK CG</b>	Não-agressiva	16	1,30	0,52 -2,70	16,91	271,50	105,500	0,565*
	Agressiva	15	0,90	0,00- 3,10	15,03	225,50		
<b>RANK total</b>	Não-agressiva	16	15,15	7,02 -27,50	15,19	243,00	107,000	0,607*
	Agressiva	15	15,60	10,10 -31,10	16,87	253,00		
<b>RANKL MO</b>	Não-agressiva	16	16,15	10,62 -19,77	17,25	276,00	100,000	0,429*
	Agressiva	15	12,80	7,90 -18,60	14,67	220,00		
<b>RANKL CG</b>	Não-agressiva	16	0,80	0,17 -1,57	15,22	243,50	107,500	0,620*
	Agressiva	15	0,80	0,30 -2,40	16,83	252,50		
<b>RANKL total</b>	Não-agressiva	16	15,00	11,47 -19,65	16,78	268,50	107,500	0,621*
	Agressiva	15	13,10	8,40 -19,20	15,17	227,50		
<b>OPG MO</b>	Não-agressiva	16	3,55	1,90 -6,67	13,91	222,50	86,500	0,185*
	Agressiva	15	4,30	3,60 -7,90	18,23	273,50		
<b>OPG CG</b>	Não-agressiva	16	0,95	0,62 -1,57	17,91	286,50	89,500	0,227*
	Agressiva	15	0,50	0,30 -1,80	13,97	209,50		
<b>OPG total</b>	Não-agressiva	16	4,50	2,90 -10,00	14,56	233,00	97,000	0,363*
	Agressiva	15	6,00	4,05 -9,10	17,53	263,00		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral / UFRN

MO- Célula Mononucleada, CG- Célula Gigante Multinucleada

\* Teste de Mann-Whitney

De acordo com a tabela 08, pode-se observar que na amostra pesquisada, LCCG agressivas e LCCG não-agressivas não revelaram diferenças significativas na quantidade de células positivas para os anticorpos anti-RANK, anti-RANKL e anti-OPG. Nesse sentido, denota-se que independentemente da agressividade das LCCG, a imunoexpressão do RANK, RANKL e OPG é semelhante nessas lesões.

De conformidade com a proporção de células totais RANKL e OPG positivas, três grupos foram categorizados: RANKL>OPG, OPG>RANKL e RANKL=OPG, para fins de comparação entre as lesões (Tabela 08).

**Tabela 08.** Tamanho da amostra e porcentagem da proporção RANKL/OPG em relação aos tipos de lesões. Natal/ RN, 2010.

Tipo de lesão	Proporção RANKL/OPG				p
	RANKL>OPG n (%)	OPG>RANKL n (%)	OPG=RANKL n (%)	TOTAL n (%)	
LCCG Não-agressiva	14 (87,5%)	0 (0%)	2 (12,5%)	16 (100%)	<b>0,003*</b>
LCCG Agressiva	13 (86,7%)	2 (13,3%)	0 (0%)	15 (100%)	
Lesão Periférica	12 (40%)	12 (40%)	6 (20%)	30 (100%)	
<b>TOTAL</b>	39 (63,9%)	14 (23%)	8 (13,1%)	61 (100%)	

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral / UFRN

LCCG- Lesão Central de Células Gigantes

\* Teste Qui-quadrado

Os dados contidos na tabela 08 demonstram que houve associação estatisticamente significativa entre a proporção de RANKL maior que OPG nos casos de LCCG não-agressivas e agressivas, denotando que na maioria dos casos de LCCG houve maior expressão do Ligante do RANK que o antagonista deste em relação às LCCG.

Para verificação de possíveis correlações entre a quantidade de células imunomarcadas pelos anticorpos anti-RANK, anti-RANKL, anti-OPG com os tipos celulares e o tamanho das lesões, foi aplicado o teste de correlação de Spearman, por esta última tratar-se de uma variável quantitativa ordinal.

**Tabela 09.** Coeficiente de correlação de Spearman (*r*) e sua significância estatística entre a marcação dos anticorpos RANK, RANKL e OPG nos diferentes tipos celulares em lesões de células gigantes. Natal/ RN, 2010.

RANK MO	RANK CG	RANKL MO	RANKL CG	OPG MO	OPG CG	RANK total	RANKL total	OPG total
RANK MO <i>r</i>	0,110	0,312	0,042	0,312	-0,003	0,976	0,299	0,289
<i>p</i>	0,398*	<b>0,014*</b>	0,747*	<b>0,014*</b>	0,985	<b>0,000*</b>	<b>0,019*</b>	<b>0,024*</b>
	RANK CG <i>r</i>	0,391	0,414	0,319	0,684	0,259	0,431	0,401
	<i>p</i>	<b>0,002*</b>	<b>0,001*</b>	<b>0,014*</b>	<b>0,000*</b>	<b>0,044*</b>	<b>0,001*</b>	<b>0,001*</b>
		RANKL MO <i>r</i>	0,422	0,197	0,233	0,369	0,963	0,243
		<i>p</i>	<b>0,001*</b>	0,129*	0,070*	<b>0,003*</b>	<b>0,000*</b>	0,059
			RANKL CG <i>r</i>	0,101	0,362	0,086	0,487	0,171
			<i>p</i>	0,438*	<b>0,004*</b>	0,509*	<b>0,000*</b>	0,189
				OPG MO <i>r</i>	0,530	0,346	0,260	0,980
				<i>p</i>	<b>0,000*</b>	<b>0,006*</b>	<b>0,043*</b>	<b>0,000*</b>
					OPG CG <i>r</i>	0,094	0,278	0,638
					<i>p</i>	0,469*	<b>0,030*</b>	<b>0,000*</b>
						RANK total <i>r</i>	0,359	0,337
						<i>p</i>	<b>0,005*</b>	<b>0,008*</b>
							RANKL total <i>r</i>	0,310
							<i>p</i>	<b>0,015*</b>
								OPG total

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral / UFRN

MO- Célula Mononucleada, CG- Célula Gigante Multinucleada

\* Coeficiente de Correlação de Spearman

A tabela 09 demonstra uma correlação altamente significativa entre os marcadores de reabsorção óssea: RANK, RANKL e OPG com os tipos celulares mononucleadas e células gigantes multinucleadas. Para o marcador RANK houve uma correlação positiva entre a expressão deste nas células mononucleadas e dos seus ligantes nesse mesmo tipo celular, havendo a tendência dos marcadores de reabsorção se expressarem conjuntamente.

**Tabela 10.** Coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ) e sua significância estatística entre a marcação dos anticorpos RANK, RANKL e OPG nos tipos celulares segundo o tamanho nas lesões de células gigantes. Natal/ RN, 2010.

Tamanho/ marcadores	RANK MO	RANK CG	RANK total	RANKL MO	RANKL CG	RANKL total	OPG MO	OPG CG	OPG total
$r$	-0,130	-0,008	-0,171	0,093	-0,046	0,103	<b>-0,374</b>	-0,167	<b>-0,337</b>
$p$	0,328*	0,955*	0,196*	0,481*	0,730*	0,437*	<b>0,004*</b>	0,205*	<b>0,009*</b>

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral / UFRN

MO- Célula Mononucleada, CG- Célula Gigante Multinucleada

\* Coeficiente de Correlação de Spearman

O valor do coeficiente de correlação de Spearman foi altamente significativo na imunomarcagem para OPG, tanto nas células mononucleadas quanto nas células totais imunopositivas, demonstrando uma correlação negativa fraca entre a quantidade de células OPG positiva e o tamanho das lesões de células gigantes.

**Tabela 11.** Coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ) e sua significância estatística entre a marcação dos anticorpos RANK, RANKL e OPG nos tipos celulares, segundo o tamanho das lesões nas Lesões Centrais de células gigantes. Natal/ RN, 2010.

Tamanho/ marcadores	RANK MO	RANK CG	RANK total	RANKL MO	RANKL CG	RANKL total	OPG MO	OPG CG	OPG total
$r$	-0,229	-0,014	-0,230	-0,199	-0,063	0,146	<b>-0,354</b>	-0,161	<b>-0,335</b>
$p$	0,233*	0,941*	0,230*	0,300*	0,744*	0,451*	<b>0,059*</b>	0,403*	<b>0,059*</b>

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral / UFRN

MO- Célula Mononucleada, CG- Célula Gigante Multinucleada

\* Coeficiente de Correlação de Spearman

O valor do coeficiente de correlação de Spearman foi = 0,059 para expressão de OPG, tanto nas células mononucleadas quanto nas células totais imunomarcadas. No entanto, tal correlação não foi significativa, não denotando assim, uma correlação entre o tamanho das lesões e expressão de OPG nas lesões

centrais de células gigantes, apesar da significância ter se situado no limiar do nível adotado neste trabalho.

**Tabela 12.** Coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ) e sua significância estatística entre a marcação dos anticorpos RANK, RANKL e OPG nos tipos celulares, segundo o tamanho das lesões nas Lesões Periféricas de células gigantes. Natal/ RN, 2010.

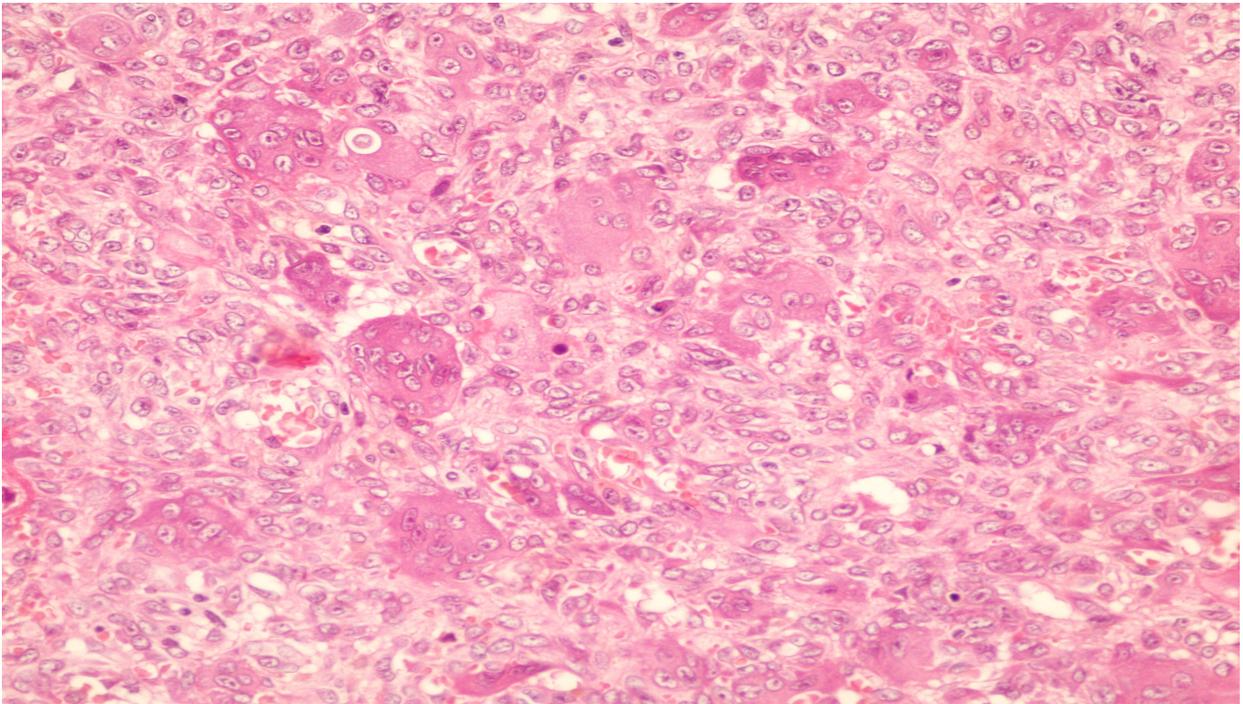
Tamanho/ marcadores	RANK MO	RANK CG	RANK total	RANKL MO	RANKL CG	RANKL total	OPG MO	OPG CG	OPG total
$r$	-0,050	-0,008	-0,026	-0,199	-0,007	0,036	-0,330	-0,111	-0,314
$p$	0,791*	0,967*	0,893*	0,300*	0,970*	0,848*	0,075*	0,561*	0,091*

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral / UFRN

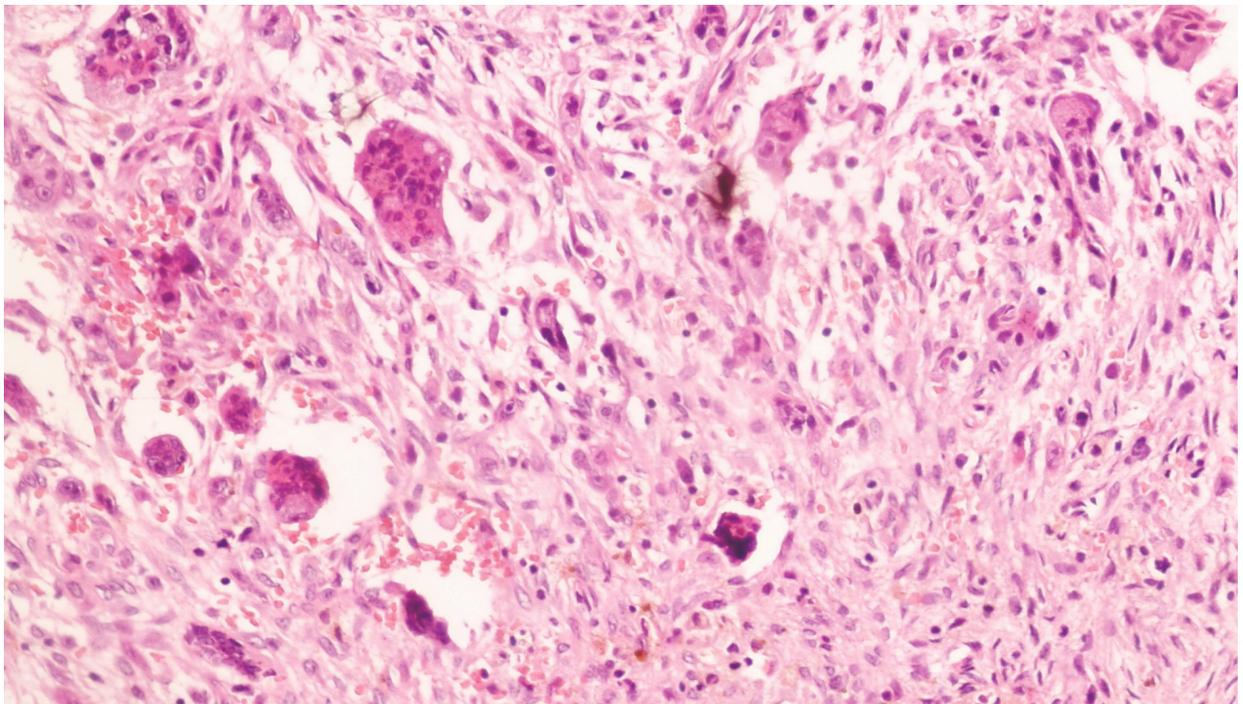
MO- Célula Mononucleada, CG- Célula Gigante Multinucleada

\* Coeficiente de Correlação de Spearman

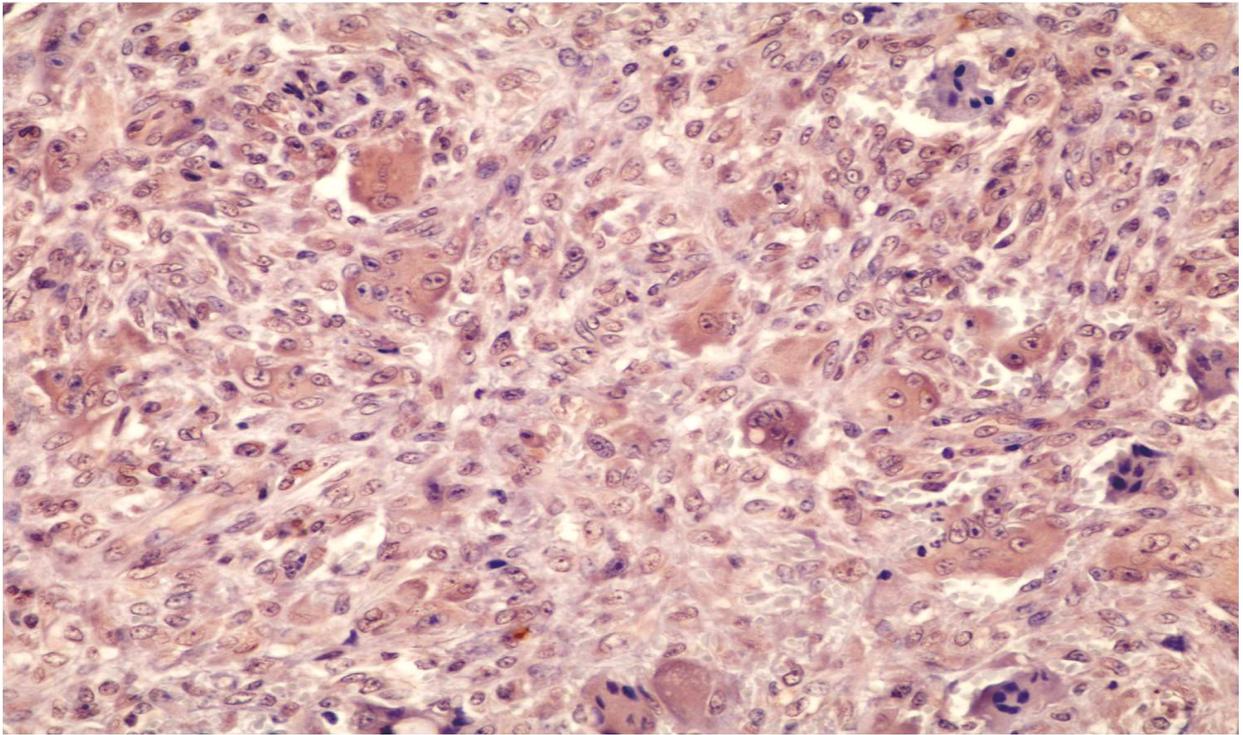
Nas lesões periféricas de células gigantes, não foi observada correlação entre o tamanho das lesões e a expressão de nenhum dos marcadores de reabsorção óssea estudados.



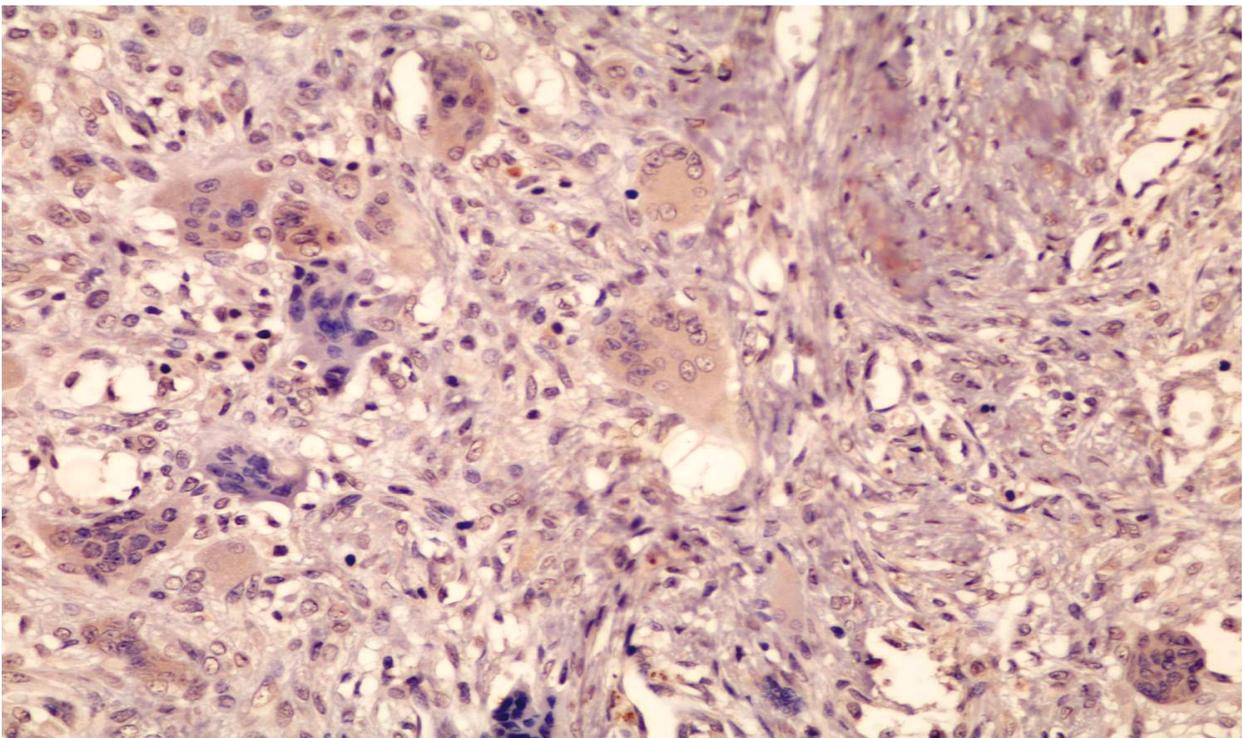
**Figura 5. Fotomicrografia de Lesão Periférica de Células Gigantes destacando a presença de inúmeras células gigantes multinucleadas (H/E, 200×).**



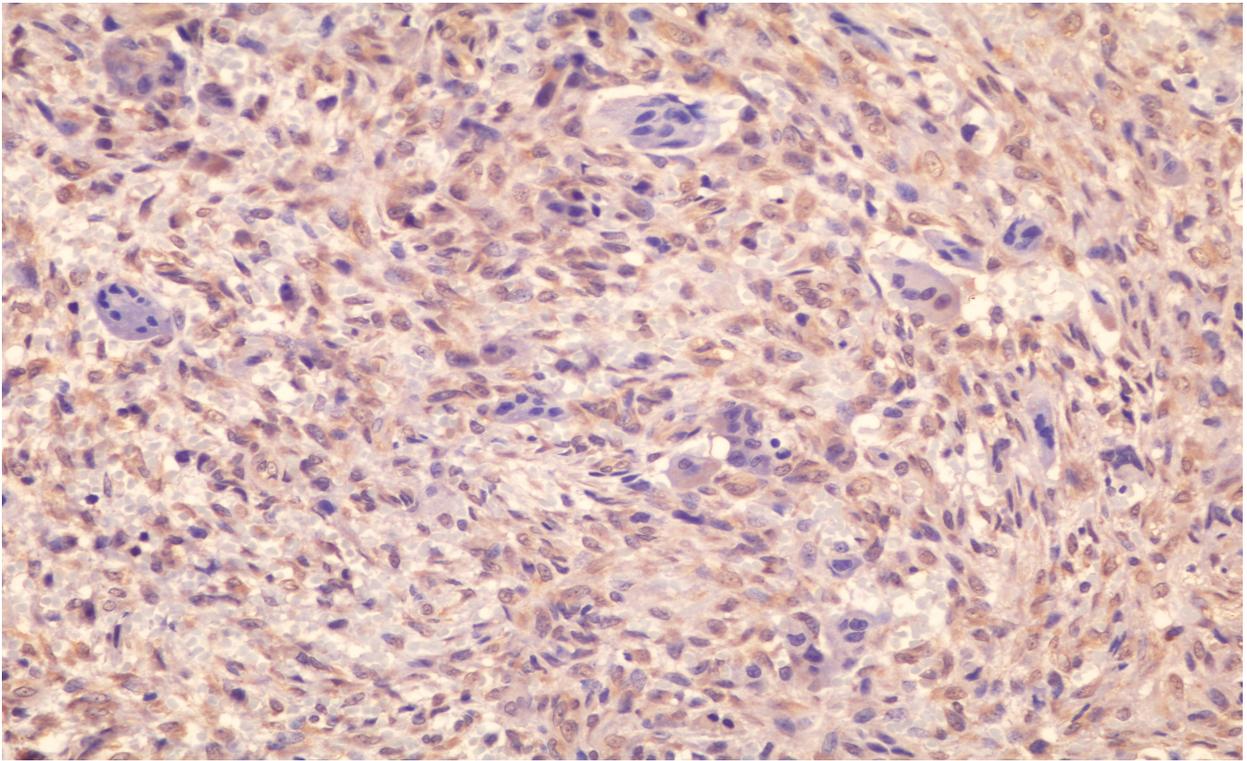
**Figura 6. Fotomicrografia de Lesão Central de Células Gigantes exibindo células mononucleadas de morfologia variada entremeadas por células gigantes multinucleadas em espécime bem vascularizado (H/E, 200×).**



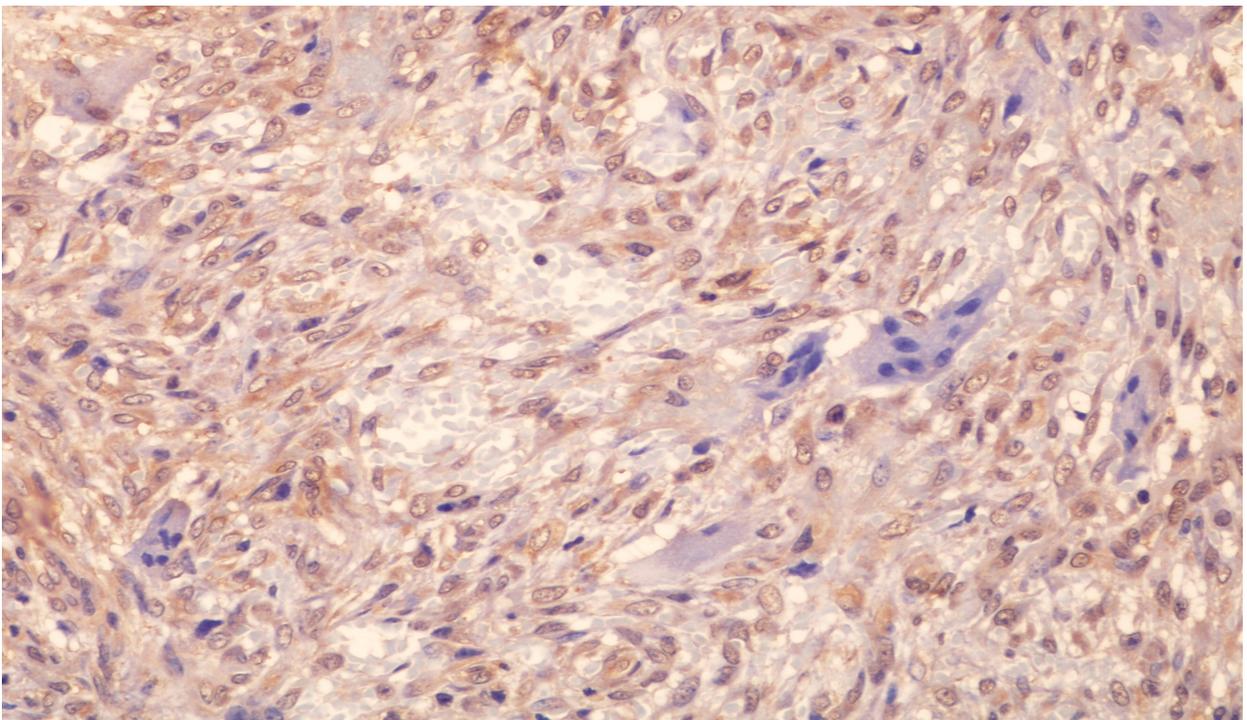
**Figura 7. Fotomicrografia exibindo imunopositividade para RANK nas células gigantes e mononucleadas em lesão central de células gigantes (LSAB, 400×).**



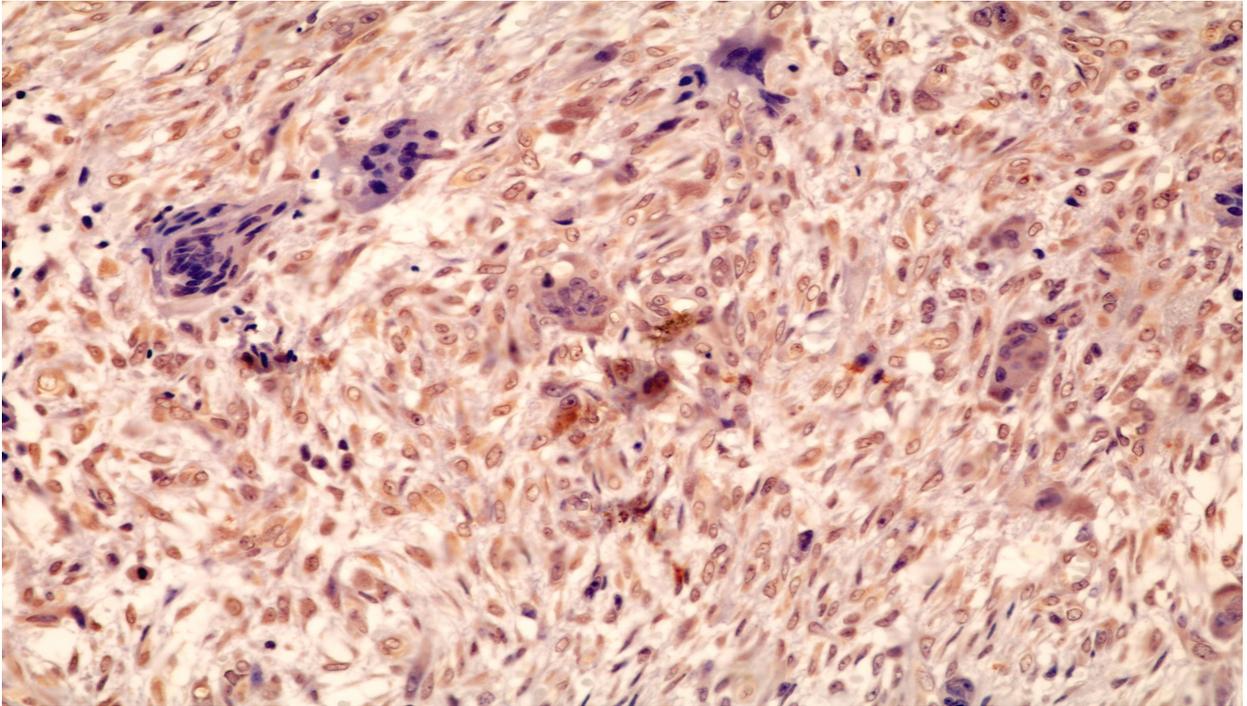
**Figura 8. Fotomicrografia destacando as células gigantes imunomarcadas para RANK em lesão periférica de células gigantes (LSAB, 400×).**



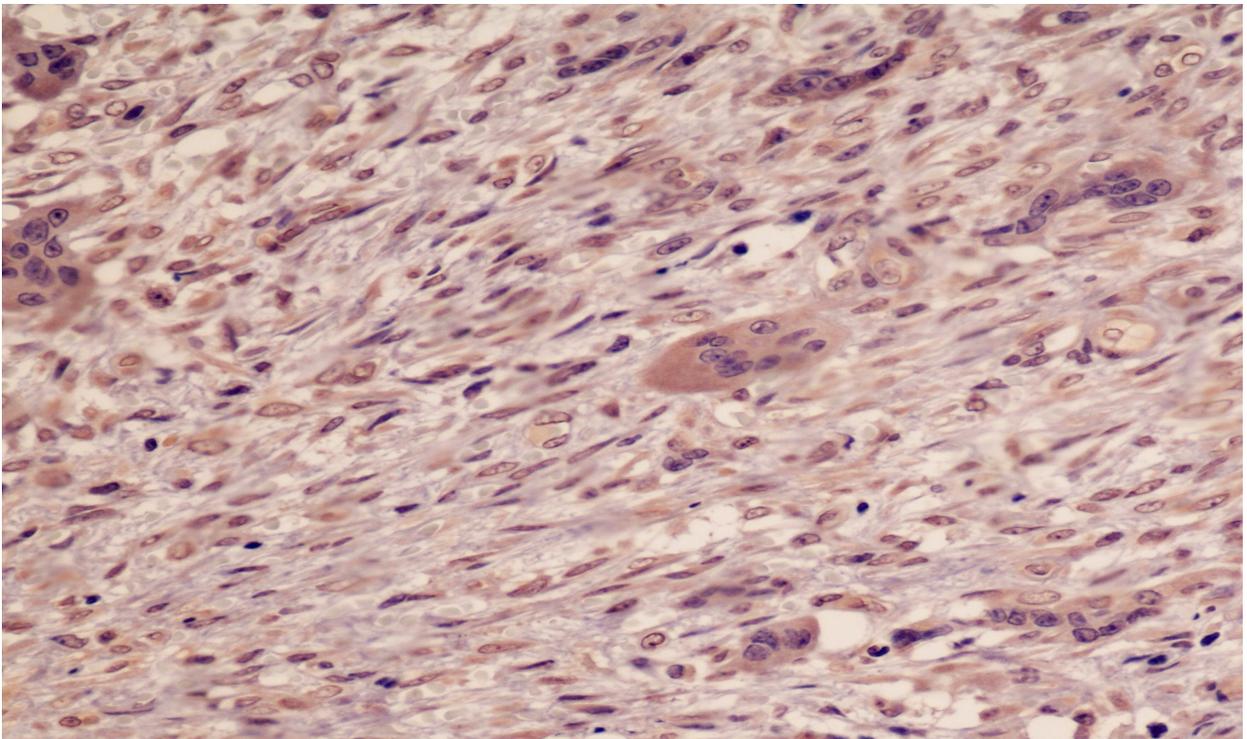
**Figura 9. Fotomicrografia exibindo imunopositividade para RANKL nas células mononucleadas em lesão central de células gigantes (LSAB, 400×).**



**Figura 10. Fotomicrografia demonstrando marcação para RANKL nas células mononucleadas em lesão periférica de células gigantes (LSAB, 400×).**



**Figura 11. Fotomicrografia exibindo expressão imuno-histoquímica da OPG nas células mononucleadas em lesão central de células gigantes (LSAB, 400×).**



**Figura 12. Fotomicrografia destacando imunomarcção para OPG nas células multinucleadas e mononucleadas em lesão periférica de células gigantes (LSAB, 400×).**



## 6 DISCUSSÃO

As Lesões de Células Gigantes, central e periférica, fazem parte do grupo de lesões dos maxilares que contêm células gigantes multinucleadas (SAPP; EVERSOLE; WY SOCK, 1999; LI; YU; LI 2003). Essas lesões podem manifestar-se na forma intra-óssea (LCCG) e também em tecido mole (LPCG) (TIFFEE; AUFDEMORTE, 1997; LIU; YU; LI, 2003; NEVILLE et al., 2009). LCCG e LPCG apresentam características histopatológicas similares, contudo, têm um comportamento clínico variável e diferente. Não está completamente elucidado se uma representa a contraparte da outra ou se são entidades distintas (SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000; FLÓREZ-MORENO et al., 2008; NEVILLE et al., 2009).

A etiopatogênese das lesões de células gigantes ainda não está esclarecida (KAUZMAN et al., 2004; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; DE LANGE et al., 2007b). Alguns pesquisadores acreditam que a LCCG seja uma lesão reacional, embora casos mais agressivos possam ser considerados neoplasmas verdadeiros (REGEZI, 2002; POGREL, 2003; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006a).

Tem sido sugerido que desregulação do ciclo celular, devido à expressão aberrante da proteína ciclina-D1 pode estar implicada na patogênese das LCCG (KAUZMAN et al., 2004). Já Kaban et al. (2007) defendem que as LCCG sejam lesões proliferativas vasculares. Discordando desses autores, Vered, Buchner e Dayan (2006a) analisaram a expressão de VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) em LCCG e constataram uma baixa atividade angiogênica nessas lesões, na qual não justificaria a hipótese desta lesão ser considerada uma verdadeira lesão vascular.

Recentemente, verifica-se na literatura que mutações no gene SH3BP2 têm sido associadas ao querubismo, entretanto, tem suscitado discussões se alterações genéticas envolvendo este gene estejam relacionadas ao desenvolvimento das lesões de células gigantes (DE LANGE et al. 2007a; 2007b; IDOWU et al., 2008; LIETMAN; YIN; LEVINE, 2008; AMARAL et al., 2009; CARVALHO et al., 2009).

Idowu et al. (2008) estudaram 26 casos de lesões de células gigantes (15 LCCG e 11 LPCG) e não evidenciaram mutações no gene SH3BP2, sugerindo que mutações nesse gene tanto nas células somáticas quanto nas células da linhagem germinativa não estariam implicadas na patogênese das lesões de células gigantes dos maxilares. Corroborando com esses autores De Lange et al. (2007b) e Amaral et al. (2009) também não observaram nenhuma alteração genética no gene SH3BP2 em LCCG agressivas e LPCG, respectivamente. Contudo, De Lange et al. (2007b) não descartam a possibilidade de que mutação em um grupo específico de células somáticas pode causar lesões centrais de células gigantes.

Carvalho et al (2009) encontraram em paciente com LCCG não-agressiva, uma mutação no exon 11 (1442A>T) do gene SH3BP2, porém essa mutação não foi detectada nas células germinativas, apenas nas células tumorais. Dessa forma, demonstra-se que mais pesquisas são necessárias para elucidar o envolvimento genético na patogênese das lesões de células gigantes, central e periféricas, dos maxilares.

Quanto às LPCG, acredita-se que estas não sejam neoplasmas verdadeiros, podendo ser causadas por irritantes locais ou trauma. Diferentes fatores locais, incluindo extrações dentárias complicadas, mal posicionamento dental, presença de placa (biofilme dental) e cálculo podem estar associados ao desenvolvimento destas lesões (CARVALHO et al., 1995; BODNER et al., 1997; CHAPARRO-AVENDAÑO; AYTÉS; ESCODA, 2005).

No presente estudo, a média de idade foi de 37,93 anos, achados semelhantes aos de Motamedi et al. (2007) e aos de Flórez-Moreno et al. (2008), em que a média de idade por eles encontrada foi de 31,02 anos e 33,5 anos, respectivamente, porém divergindo de Chaparro-Avendaño, Aytés e Escoda (2005), em que na série de casos desses pesquisadores a manifestação inicial aconteceu por volta dos 52 anos e aos 50 anos nos estudos de Gándara Rey et al. (2002).

As LPCG têm predileção pelo sexo feminino (MIGHELL; ROBINSON; HUME, 1995; BODNER et al., 1997; GÁNDARA REY et al., 2002; MOTAMEDI

et al., 2007; NEVILE et al., 2009). Contudo, os resultados da amostra estudada diferiram da maioria dos autores, pois se encontrou uma discreta predominância de pacientes do sexo masculino (53,3%). Há autores que sugerem a associação entre a influência hormonal e o desenvolvimento dessa entidade patológica em mulheres (CSILLAG et al. 1997 apud STAVROPOULOS; KATZ, 2002; GÜNHAN et al., 1998).

Quanto à localização anatômica, estudos têm mostrado que a mandíbula é o osso gnático mais frequentemente acometido, e a região posterior dos maxilares, o sítio de maior ocorrência (BODNER et al., 1997; CHAPARRO-AVENDAÑO; AYTÉS; ESCODA, 2005; MOTAMEDI et al., 2007). Em discordância desses autores, na presente pesquisa, verificou-se que ambos maxilares foram igualmente acometidos, sendo a região anterior a mais comumente acometida.

As LPCG apresentam crescimento lento, sendo geralmente lesões pequenas (menor que 2cm) (GÁNDARA REY et al., 2002; CHAPARRO-AVENDAÑO; AYTÉS; ESCODA, 2005; NEVILLE et al., 2009), fato constatado na amostra ora avaliada em que o tamanho médio das lesões periféricas foi de 2,05 cm.

Com relação às Lesões Centrais de Células Gigantes, esta pesquisa constatou que as lesões avaliadas provieram de pacientes jovens com média de idade de 23,29 anos, em concordância com os estudos desenvolvidos por Stavropoulos e Katz (2002), De Lange e van den Akker (2005), Aragão et al. (2006), Farrier et al. (2006), Motamedi et al. (2007), Susarla et al. (2009) e Resnick et al. (2010), que relataram que as LCCG acometem pacientes na 2ª e 3ª décadas de vida.

As LCCG atingem preferencialmente pacientes do sexo feminino (REGEZI, 2002; STAVROPOULOS; KATZ, 2002; SHEDDI; MOSADOMI, 2004; DE LANGE; van den AKKER, 2005; ARAGÃO et al., 2006; MOTAMEDI et al., 2007; FLÓREZ-MORENO et al., 2008; NEVILLE et al., 2009; HOUPIS et al., 2009; SUN et al., 2009; RESNICK et al., 2010). Corroborando com esses autores, observou-se que os casos de LCCG analisados no presente trabalho

demonstraram um predomínio no sexo feminino. Porém, divergindo desses dados, Farrier et al. (2006) encontraram maior prevalência do sexo masculino nos casos por eles analisados. Em relação à localização, as LCCG têm predileção pela mandíbula (REGEZI, 2002; STAVROPOULOS; KATZ, 2002; SHEDDI; MOSADOMI, 2004; DE LANGE; van den AKKER, 2005; FARRIER et al., 2006; MOTAMEDI et al., 2007; FLÓREZ-MORENO et al., 2008; SUN et al., 2009; RESNICK et al., 2010), corroborando com esses autores, a maioria dos casos ora analisados localizou-se neste osso gnático (58,1%). Apesar dos trabalhos, como os descritos por Stavropoulos e Katz (2002), De Langer e van den Akker (2005) apontarem a região anterior como o sítio preferencial para as LCCG, os resultados da presente pesquisa demonstraram uma predominância das lesões na região posterior dos maxilares, e esse resultado comunga com os achados por Motamedi et al. (2007).

Os aspectos imaginológicos das LCCG são variáveis (STAVROPOULOS; KATZ, 2002; FARRIER et al., 2006; SUN et al., 2009). Destarte, os achados radiográficos observados nesse trabalho foram consoantes aos divulgados na literatura pertinente, demonstrando lesões radiolúcidas uniloculares ou multiloculares, com alguns casos exibindo focos de radiopacidade, contudo, houve predomínio de uma radiolucidez unilocular (45,2%). Com relação as dimensões das lesões, no presente estudo, o tamanho médio das LCCG foi de 3,55 cm, semelhante aos resultados encontrados por Stavropoulos e Katz (2002), que relataram tamanho médio de 3,6 cm.

As Lesões de células gigantes, normalmente, são lesões assintomáticas e de crescimento lento, porém em alguns casos, as LCCG demonstram expansão rápida e dor (FICARRA; KABAN; HANSEN, 1987; REGEZI, 2002; CHAPARRO-AVENDAÑO; AYTÉS; ESCODA, 2005; De LANGE; van den AKKER, 2005; MOTAMEDI et al., 2007; FLÓREZ-MORENO et al., 2008). A dor pode ser devido à presença de citocinas, como as interleucinas, liberadas pelas próprias células mononucleadas no meio ambiente lesional, como descrito em casos dos TCG dos ossos longos (Huang et al. 2000). Adicionalmente, Flórez-Moreno et al. (2008) mencionaram que a superexpressão de CD68 e

elevada proporção de macrófagos presentes nas LCCG em relação às LPCG podem estar relacionados com o comportamento clínico distinto das LCCG, inclusive sintomatologia e taxa de crescimento.

Conforme o comportamento clínico, este baseado nas características clínicas e radiográficas das lesões, tem sido sugerido que as LCCG dos maxilares podem ser classificadas, de acordo com a sua agressividade, em duas categorias: lesões centrais não-agressivas ou agressivas (CHUONG et al., 1986; NEVILLE et al., 2009). Nesse estudo, empregamos a classificação das LCCG proposta por Chuong et al. (1986) por se tratar do clássico trabalho sobre classificação dessas lesões.

No grupo das LCCG não-agressivas, a média de idade de 25,8 anos difere das médias descritas por Chuong et al. (1986) e Kruse-Lösler et al. (2006), cujos achados foram em pacientes mais jovens, com 9,3 anos e 15,3 anos. Contudo, vale ressaltar que dentro da amostra analisada, os casos não-agressivos tiveram a média de idade maior que as lesões consideradas agressivas. No que concerne ao sexo, descreve-se na literatura uma predileção pelo sexo feminino (FICARRA; KABAN; HANSEN, 1987; KRUSER-LÖSLER et al., 2006), fato não observado nessa pesquisa, semelhante aos descritos por O'Malley et al. (1997), que não evidenciaram predileção por sexo. A análise do sítio anatômico destacou maior ocorrência de lesões na mandíbula (62,5%), em especial a região posterior, em consonância aos divulgados na literatura pertinente (CHOUNG et al., 1986; FICARRA; KABAN; HANSEN, 1987; O'MALLEY et al., 1997; KRUSER-LÖSLER et al., 2006; DEWSNUP et al., 2008). O tamanho médio das LCCG não-agressivas, em torno de 3,78 cm, é similar ao relatado por Chuong et al. (1986), em que o diâmetro médio das lesões foi de 3,7 cm, porém ressalta-se que o maior diâmetro das LCCG foi encontrado nesse grupo de lesões (8 cm).

Quanto aos casos de LCCG agressivos, a idade média de acometimento das lesões, a prevalência no sexo feminino e a localização com o predomínio da mandíbula, foram achados em conformidade com os descritos por Ficarra, Kaban e Hansen (1987); O'Malley et al. (1997); De Lange e van den Akker (2005);

Kruser-Lösler et al. (2006); Kaban et al. (2007); Dewsnup et al. (2008) e Susarla et al. (2009). Já o tamanho médio das lesões desse grupo (3,27cm) difere do descrito por Chuong et al. (1986) em que observaram maior diâmetro nas lesões agressivas (em torno de 5,8cm).

Radiograficamente, tanto as LCCG não-agressiva quanto as agressivas revelaram maior prevalência de lesões radiolúcidas uniloculares, em congruência com os achados de Kruse-Lösler et al. (2006) em que descrevem que todas as LCCG demonstram uma imagem radiolúcida, que pode ser unilocular (não septada) ou multilocular (com vários septos), havendo porém o predomínio da primeira.

No presente estudo, de um modo geral, verificou-se, pela análise microscópica dos cortes histológicos corados em H/E, que as lesões exibiam uma proliferação de células com morfologia ora fusiformes ora ovóides, entremeadas com células gigantes multinucleadas de número e tamanho diversos com quantidade variada de núcleos. O tecido conjuntivo era do tipo fibroso, moderadamente vascularizado, e em muitos dos casos evidenciaram-se hemácias extravasadas com pigmentação por hemossiderina. Em congruência com os aspectos descritos por Carvalho et al. (1995); Regezi (2002); Itonaga et al. (2002); Liu, Yu e Li (2003); Chaparro-Avendaño, Aytés e Escoda (2005); Neville et al. (2009).

A interação entre os componentes celulares, células mononucleadas e multinucleadas, presentes nas lesões de células gigantes tem provocado várias discussões, principalmente no que concerne a formação das células gigantes multinucleadas. Aventa-se a hipótese de que as células gigantes sejam osteoclastos, enquanto que as células mononucleadas constituem uma população heterogênea de células descritas ora como monócitos ora como fibroblastos ou miofibroblastos ora como osteoblastos (CARVALHO et al., 1995; CHUONG et al., 1986; TIFTEE; AUFDEMORTE, 1997; O'MALLEY et al. 1997; ITONAGA et al., 2003; LIU; YU; LI 2003; TOBÓN-ARROYAVE et al., 2005; VERED;

BUCHNER; DAYAN, 2006a; VERED et al., 2007; FLÓREZ-MORENO et al., 2008; HOUPIS et al., 2009).

As células gigantes presentes nas lesões de células gigantes, podem ser formadas pela fusão de células progenitoras da linhagem monocítica/macrofágica. Como essas lesões, tanto LCCG e LPCG, normalmente são bem vascularizadas, o componente vascular pode providenciar os monócitos da circulação. As células mononucleadas lesionais são provavelmente as responsáveis pelo recrutamento e diferenciação das células gigantes (LIU; YU; LI, 2003; TOBÓN-ARROYAVE et al., 2005).

Variações na vascularização de LCCG e LPCG têm sido descritas. Achados imuno-histoquímicos e ultra-estruturais, verificados por Lim e Gibbins (1995) em LPCG, sugerem variações na microcirculação dessas lesões, em que as áreas mais profundas dos espécimes, onde principalmente localizam-se as células gigantes, apresentam microvascularização funcionalmente imaturas diferentes da periferia da lesão. Em conformidade com esses autores, Quinderé et al. (2008) observaram fraca expressão de colágeno IV nos vasos sanguíneos localizados nas porções mais profundas dos espécimes de LCCG e LPCG. Isso pode ser reflexo da presença de estruturas vasculares malformadas ou funcionalmente imaturas. Dessa forma, suscitando a existência de uma provável ligação das alterações ultra-estruturais vasculares com a presença de células gigantes multinucleadas.

Vered, Bucher e Dayan (2006a) observaram que as LCCG possuem baixa atividade angiogênica, apesar do número significativo de células mononucleadas e multinucleadas positivas para o VEGF. Para os autores, a síntese de fatores angiogênicos por células mononucleadas e multinucleadas seria um mecanismo importante no processo de osteoclastogênese, o qual contribuiria para o crescimento destas lesões.

A identificação do sistema RANK/RANKL/OPG como mediador final da osteoclastogênese representou um grande avanço no estudo da biologia óssea. As pesquisas que envolvem reabsorção óssea analisam o sistema RANK-RANKL-OPG, pois essas moléculas são fatores chaves na regulação do metabolismo

ósseo (HUANG et al., 2000; ATKINS et al., 2000; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001; KHOSLA, 2001; CROTTI et al., 2003; TAY et al., 2004; MENEZES et al., 2006; BOSTANCI et al., 2007; SILVA et al., 2008; ANDRADE et al., 2008; GALLAGHER, 2008; ANANDARAJAH, 2009). Poucos trabalhos têm sido descritos avaliando o sistema de reabsorção óssea RANK-RANKL-OPG em lesões de células gigantes dos maxilares.

Na presente pesquisa, estudou-se a imunexpressão dos anticorpos anti-RANK, anti-RANKL e anti-OPG em LCCG e LPCG, observando imunomarcação em todos os casos da amostra analisada. Em relação aos componentes celulares destas lesões, evidenciou-se positividade nas células mononucleadas em todos os casos, para os três marcadores. Em relação às células gigantes multinucleadas, em alguns casos não foi evidenciado imunopositividade nessas células, principalmente para o marcador RANKL.

A expressão de RANK e OPG foi detectada nas células mononucleadas e multinucleadas, estando em consonância com achados relatados por Huang et al. (2000) e Atkins et al. (2000; 2001; 2006), os quais observaram expressão dessas proteínas nos mesmos componentes celulares, porém em TCG dos ossos longos.

Li, Yu e Li (2003) detectaram a expressão do RNAm de RANKL, RANK e OPG em lesões dos maxilares contendo células gigantes multinucleadas (LCCG, LPCG, querubismo e cisto ósseo aneurismático), encontrando positividade para OPG em todos os tipos celulares estudados. Com relação ao RANK foi observado expressão nas células mononucleares ovóides e nas células gigantes, enquanto o RANKL principalmente nas células mononucleares fusiformes e ausente nas células gigantes multinucleadas. No presente estudo, RANKL foi expresso também nas células gigantes, fato observado diferente dos descritos por autores como Huang et al., 2000; Atkins et al., 2000; Atkins et al., 2001; Liu, Yu, Li, 2003, mas em concordância com os achados de Kartsogiannis et al. (1999) e Morgan et al. (2005) em TCG.

A expressão desses fatores de reabsorção óssea nos diferentes tipos celulares presentes nas lesões de células gigantes estudadas nos remete ao fato

de que as células mononucleadas que expressam RANKL e as células gigantes multinucleadas RANK positivas sugerem um fenótipo semelhante com osteoblastos e osteoclastos, respectivamente (KARTSOGIANNIS et al., 1999; HUANG et al., 2000; ATKINS et al., 2000; ATKINS et al., 2001; ITONAGA et al., 2003; LIU; YU; LI, 2003; LAU et al., 2005; TOBÓN-ARROYAVE et al., 2005).

Não obstante a falta de referências na literatura pertinente, até os dias atuais, não há nenhum trabalho comparando a expressão dos marcadores de reabsorção óssea entre LCCG e LPCG. Por isso, torna-se difícil comparar os dados do presente trabalho com os da literatura nessas lesões, especificamente.

Comparando a imunexpressão dos fatores de reabsorção óssea RANK, RANKL e OPG entre as lesões centrais e periféricas de células gigantes, evidenciou-se diferença estatística significativa apenas na expressão do marcador RANKL nas células mononucleadas ( $p=0,002$ ) e células totais ( $p=0,003$ ) entre os casos de LCCG e LPCG. A maior expressão do marcador RANKL nos casos de LCCG confirma o maior potencial reabsortivo das lesões centrais em relação às lesões periféricas, suportando os achados clínicos/radiográficos observados nas LCCG.

Houpis et al. (2009) detectaram maior expressão de PTHrP (Peptídeo relacionado ao Paratormônio) e PTHR1 (Receptor do Paratormônio do tipo 1) nas células gigantes multinucleadas do tipo II das LCCG em relação às LPCG, e que houve maior expressão de PTHrP nas células mononucleadas de formato fusiforme das LCCG, comparado com as LPCG. Adicionalmente, verificaram que as populações celulares são semelhantes entre as lesões. Contudo, os autores sugerem que não é pela expressão PTHrP/PTHR1 nas LPCG e LCCG que as lesões apresentam comportamento diferente.

No presente estudo, observou-se diferença na expressão do RANKL entre os casos de LCCG e LPCG e associação na proporção RANKL maior que OPG ( $p=0,001$ ), fato que leva a crer que a expressão diferenciada de algumas moléculas da via de reabsorção óssea entre as lesões centrais e lesões periféricas de células gigantes creditam a atividade reabsortiva diferenciada entre elas.

A análise da matriz extracelular, realizada por Quinderé et al. (2008), na qual analisaram a expressão imuno-histoquímica das proteínas colágeno IV, tenascina e fibronectina, em LCCG e LPCG, não demonstraram diferenças na expressão dessas proteínas entre as lesões analisadas. Assim, sugerem que esses componentes da matriz extracelular não permitem estabelecer diferenças marcantes entre as LCCG e LPCG. Contudo, conforme ressaltado por Flórez-Moreno et al. (2008), apesar da similaridade histológica entre as LCCG e LPCG, diferenças nos padrões morfométricos, como núcleos maiores e irregulares das células gigantes, bem como maior imunorreatividade para macrófagos (CD68) nas LCCG que nas LPCG, podem estar relacionados com o comportamento clínico mais agressivo das LCCG.

Huang et al. (2000) encontraram maior expressão de RANKL que OPG nos TCG, quando comparados com o tecido ósseo normal, sugerindo que a produção desta molécula pode ser de grande importância na formação das células gigantes encontradas nestes tumores e, conseqüentemente, na reabsorção óssea evidenciada nessas lesões. Na presente pesquisa, avaliando a proporção RANKL/OPG, evidenciou-se que a expressão do ligante do RANK foi maior que OPG nas LCCG, diferindo do grupo LPCG que apresentaram distribuição uniforme na proporção desses marcadores. Tais achados são semelhantes às observações de Atkins et al. (2000) que encontraram maior proporção da expressão RANKL/OPG nos casos TCG dos ossos longos comparados com outros tumores osteolíticos e não osteolíticos.

Itonaga et al. (2002) e Itonaga et al. (2003) estudaram a expressão de RANKL, CD68 e PCNA em TCG e LCCG, respectivamente, e observaram que as células mononucleadas de morfologia fusiformes expressavam PCNA e RANKL, sendo capazes de promover a formação de osteoclastos em cultura de células. Além disso, as células gigantes foram positivas para o CD68. Os resultados dessas pesquisas foram idênticos tanto nos TCG quanto nas LCCG.

Kauzman et al. (2004) analisaram as proteínas do ciclo celular em casos de LCCG e verificaram que as proteínas do ciclo celular (Ciclina B1 e Ki-67) estavam restritas as células mononucleadas. Ademais, sugerem que desregulação

no ciclo celular pode estar envolvido na patogênese das LCCG. Esses achados são semelhantes aos resultados encontrados por Kauzman et al. (2003) em TCG, sugerindo assim, que TCG dos ossos longos e LCCG representam um processo patológico similar, porém com diferenças nas localizações anatômicas envolvidas.

Aragão et al. (2006) avaliaram os aspectos clínicos e histopatológicos das LCCG e TCG dos ossos longos e encontraram similaridades marcantes desses aspectos entre as lesões analisadas. Adicionalmente, Aragão et al. (2007) estudaram a imunexpressão de proteínas da matriz extracelular, fibronectina e tenascina, e CD68 em LCCG e TCG dos ossos longos e observaram um padrão de imunexpressão da fibronectina e da tenascina semelhante entre as lesões, indicando que essas proteínas não podem explicar as diferenças entre LCCG e TCG, suportando a observação que essas lesões possam representar um processo patológico único.

Resnick et al. (2010) analisaram as características clínicas e radiográficas das LCCG dos maxilares e TCG dos ossos longos e verificaram similaridade nos aspectos analisados entre essas lesões, destacando que as LCCG podem ser diagnosticadas precocemente, por conta da localização destas nos maxilares, sendo assim, facilmente perceptível pelo próprio paciente.

Dessa forma, os autores supracitados destacam não haver diferença significativa entre as LCCG e TCG, suscitando a possibilidade de representar um processo patológico único, modificado pela idade dos pacientes, localização das lesões, bem como por fatores ainda não completamente estabelecidos.

Enaltecendo as sobreposições de aspectos ora relatados e os resultados da presente pesquisa, como imunomarcações de RANK e RANKL nos tipos celulares similares e elevada expressão de RANKL maior que OPG, conduzem-nos a especular que devido aos achados semelhantes nas lesões estudadas, a exemplo do que ocorre nos TCG, a LCCG aparenta similaridade ao TCG com relação à expressão dos fatores de reabsorção óssea, podendo representar a

mesma entidade patológica. Contudo, ressalta-se que outros estudos devem ser realizados para confirmar essa assertiva.

Comparando as LPCG com LCCG, subdivididas conforme a agressividade, encontrou-se uma diferença estatística altamente significativa apenas na imunexpressão do anticorpo anti-RANKL, tanto nas células mononucleadas ( $p=0,006$ ) quanto nas células totais imunopositivas ( $p=0,010$ ). Contudo, não foi observada diferença na expressão de nenhum dos marcadores entre as LCCG agressivas e não-agressivas.

Congruente com os achados do presente estudo, Tobón-Arroyave et al. (2005) observaram expressão do RANK nas CG e nas células mononucleadas ovóides, sem diferença estatística na expressão desta proteína entre os casos agressivos dos não-agressivos de LCCG. Esses autores ressaltaram que, apesar de não haver diferença na expressão desse marcador entre as LCCG, os achados sugerem que o mecanismo pelo quais as células, mononucleares e multinucleadas presentes nas lesões de células gigantes, induzem a reabsorção óssea está provavelmente relacionado à ligação RANK/RANKL, semelhante à situação normal dos osteoclastos.

Com base nos resultados da presente pesquisa, sugere-se que as LCCG, independente da agressividade, comportam-se de forma semelhante na expressão dos fatores de reabsorção óssea. Assim, diferença no comportamento biológico das LCCG aparentemente não guarda relação com alterações na expressão dos fatores de reabsorção óssea. Outros fatores, ainda não completamente esclarecidos, devem estar envolvidos para proporcionar o comportamento clínico mais agressivo evidenciados em alguns casos de LCCG.

Analisando a proliferação celular entre os casos agressivos e não-agressivos das LCCG, O'Malley et al. (1997) e Kruse-Lösler et al. (2006) observaram que o componente proliferativo das LCCG estava presente na população celular mononuclear dessas lesões, porém não encontraram diferença no índice de proliferação celular entre as lesões agressivas e não-agressivas.

Vered et al. (2007) detectaram a presença de miofibroblastos nas LCCG tanto agressivas quanto não-agressivas, entretanto, não observaram diferença na densidade média dessas células entre as LCCG, sugerindo que esse componente celular não é distinguível entre LCCG agressivas e não-agressivas.

A agressividade nos casos de LCCG agressivas pode ser devido a grande quantidade em número de CG, bem como a maior área de superfície ocupada por essas células, além do elevado número de mitoses evidenciado no grupo de LCCG agressivas (KRUSE-LÖSLER et al., 2006). Ademais, Dewsnup et al. (2008) e Susarla et al. (2009) apontam que a elevada expressão de CD34 nos casos de LCCG pode ser um indicativo de um comportamento biológico mais agressivo, pois a densidade vascular está significativamente aumentada nas LCCG agressivas.

No que concerne ao seu tamanho, as lesões de células gigantes apresentam variações significativas, normalmente entre 1 a 5 cm (CHUONG et al., 1986; GÁNDARA REY et al., 2002; STAVROPOULOS; KATZ, 2002; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; NEVILLE et al., 2009). Os resultados da presente pesquisa demonstraram que independente do tipo de lesão, central ou periférica, na amostra analisada observou-se diferença significante na expressão da proteína OPG nas células mononucleadas ( $p=0,008$ ) e células totais ( $p=0,020$ ) e o tamanho da lesão.

Visando estabelecer uma relação entre a expressão dos marcadores pesquisados e o tamanho das lesões, verificou-se que o tamanho das lesões teve correlação negativa com expressão da proteína OPG, indicando que quanto maior o tamanho das lesões menor a expressão de OPG. Dessa forma, leva a crer que as lesões pequenas exibem menor atividade reabsortiva, e isso pode ser reflexo da atuação da proteína OPG, molécula que compete com RANKL, inibindo a ação deste na reabsorção óssea e consequentemente a expansão da lesão. Essa sugestão baseia-se no papel já bem estabelecido da ação inibitória da OPG na reabsorção óssea (SIMONET et al., 1997; TSUDA et al., 1997; YASUDA et al., 1998; BURGESS et al., 1999; KARTSOGIANNIS et al., 1999; HUANG et al.,

2000; ATKINS et al., 2001; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001; SCHOPPER; PREISSNER; HOFBAUER, 2002; BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003).

O teste de correlação de Spearman demonstrou correlação positiva entre RANK, RANKL e OPG, merecendo destaque para a tendência da expressão conjunta desses marcadores, em congruência com os achados de Huang et al. (2000) e Liu, Yu e Li (2003). Esses autores, estudando respectivamente TCG e lesões de células gigantes dos maxilares, inferiram que devido OPG encontrar-se presente ubiquamente nos 3 tipos celulares dessas lesões, é possível que exista um mecanismo de retroalimentação (*feedback* negativo) nas lesões de células gigantes, em que as próprias células tumorais podem modular a apresentação do RANKL na sua superfície, na qual pode ser inibido pela OPG.

Tumores de células gigantes dos ossos e dos tecidos moles exibem expressão dos fatores de reabsorção óssea nos seus componentes celulares, propondo que inibidores farmacológicos da reabsorção óssea podem controlar a osteólise desses tumores (LAU et al., 2005; ANANDARAJAH, 2009).

Nesse contexto convém ressaltar que o interesse tem-se voltado para o entendimento da real participação dos fatores de reabsorção óssea RANK-RANKL-OPG no desenvolvimento das lesões centrais de células gigantes, visando estratégias terapêuticas que utilizem essas moléculas para o melhor prognóstico do paciente, minimizando e controlando o dano tecidual. (TOBÓN-ARROYAVE et al., 2005, VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006b).

Finalmente, sugere-se que mais estudos serão necessários nessa área, buscando elucidar o comportamento biológico das Lesões Centrais e Periféricas de células gigantes.



## 7 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados obtidos, concluiu-se que:

- Houve diferença na imunexpressão do RANKL entre os casos de Lesões Centrais e Lesões Periféricas de Células Gigantes, assim, sugere-se uma implicação dessa molécula no comportamento clínico diferente das lesões centrais em relação às lesões periféricas, provavelmente atribuindo que o maior potencial reabsortivo das LCCG frente às LPCG pode decorrer em virtude da elevada expressão desse marcador;

- Não houve diferença na expressão das moléculas estudadas (RANK, RANKL e OPG) nas LCCG, conforme a agressividade, denotando assim, que o comportamento agressivo de algumas LCCG não se deve ao fato da expressão desses fatores de reabsorção óssea;

- Houve correlação entre a expressão dos fatores de reabsorção entre si, exibindo uma tendência de expressão conjunta das moléculas RANK, RANKL e OPG na amostra estudada, suscitando a possibilidade de existir um mecanismo de retroalimentação (*feedback* negativo) pelas próprias células lesionais;

- Demonstrou-se uma correlação negativa entre o tamanho das lesões e expressão de OPG, sugerindo que a osteoprotegerina pode ser uma molécula inibitória na expansão das lesões de células gigantes.



## REFERÊNCIAS <sup>1</sup>

AMARAL, F.R. NFATc1 and TNF $\alpha$  expression in giant cell granuloma of the jaws. **J Oral Pathol Med**, 2009. *In press*

ANANDARAJAH, A.P. Role of RANKL in bone diseases. **Trens Endocrinol Metab**, v.20, n.2, p.88-94,mar. 2009.

ANDRADE, F.R et al. Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.106, n. 4, p. 548- 55,oct. 2008.

ARAGÃO, M.S. et al. Estudo clínico e histopatológico de lesões centrais de células gigantes e tumores de células gigantes. **Cienc Odontol Bras**, v.9, n.2, p.75-82, 2006.

ARAGÃO, M.S. et al. Central giant cell granuloma of the jaws and giant cell tumors of long bones. **J Appl Oral Sci**, v.15, n.4, p. 310-6, 2007.

ATKINS, G.J. at al. Expression of osteoclast differentiation signals by stromal elements of giant cell tumors. **J Bone Miner Res**, v.15, n.4, p. 640- 9, 2000.

ATKINS, G.J. at al. Osteoprotegerin inhibits osteoclasto formation and bone resorbing activity in giant cell tumors of bone. **Bone**, v.28, n.4, apr, p.370-7, 2001.

ATKINS, G.J. at al. RANK expression as a cell surface marker of human osteoclasto precursors in peripheral blood, bone marrow and giant cell tumors of bone. **J Bone Miner Res**, v.21, n.9, apr, p.1339-49,jun. 2006.

BODNER, L. at al. Growth potential of peripheral giant cell granuloma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.83, n.5, p. 548- 51, may. 1997.

---

<sup>1</sup> Normatizada de acordo com a NBR 6023/2002

BOSTANCI, N. et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. **J Clin Periodontol**, v.34, p.370-6, 2007.

BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S.; LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v.423, p.337-42, 2003.

BURGESS, T.L. et al. The Ligand for Osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclast. **J Cell Bio**, v.145, p.527-38, 1999.

CARVALHO, Y.R. et al. Peripheral giant cell granuloma: An immunohistochemical and ultrastructural study. **Oral Dis**, v.1, p. 20-5, 1995.

CARVALHO, V.M. et al. Novel mutations in the SH3BP2 gene associated with sporadic central giant cell lesions and cherubism. **Oral Dis**, v.15, p. 106-110, 2009.

CHAPARRO-AVENDAÑO, A.V.; AYTÉS, L.B.; ESCODA, C.G. Peripheral giant cell granuloma. A report of five cases and review of the literature. **Med Oral Pathol Oral Cir Bucal**, v.10, p.48-57, 2005.

CHUANG, F-H. et al. Immunohistochemical expression of RANKL, RANK and OPG in human oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v.38, p.753-8, 2009.

CHUONG, R. et al. Central lesion cell lesions of the jaws: a clinicopathologic study. **J Oral Maxillofac Surg**, v.44, p.708-13, 1986.

CROTTI, T. et al. Rceptor activator NFκB ligand (RANKL) and osteoprotegerina (OPG) protein expression in periodontitis. **J Period Res**, v. 38, 380-7, 2003.

DE LANGE, J.; van der AKKER, H.P. Clinical and radiological features of central giant-cell lesions of the jaw. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.99, n. 4, p. 464- 470, apr. 2005.

DE LANGE, J. et al. A new mutation in the SH3BP2 gene showing reduced penetrance in a family affected with cherubism. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.103, n.3, p. 378-81, mar. 2007a.

DE LANGE, J. et al. A new mutation in the SH3BP2 gene showing reduced penetrance in a family affected with cherubism. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.45, p. 499-500, 2007b.

DEWSNUP, N.C. et al. CD34 staining density predicts giant cell tumor clinical behavior. **J Oral Maxillofac Surg**, v.66, p.928-33, 2008.

DOUGALL, W.C et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. **Gene Develop**, v.13, p. 2412- 2424,1999.

FARRIER, S.L. A 10-year review of the occurrence and treatment of central giant cell granulomas, in a District General Hospital. **J Oral Pathol Med**, v.35, p.332-7, 2006.

FICARRA, G.; KABAN, L.; HANSEN, L.S. Central giant cell lesions of the mandible and maxilla: A clinicopathologic and citometric study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.64, n. 1, p. 44- 9, jul, 1987.

FLANAGAN, A.M; TINKLER; S.M.B.; WILLIAMS, D.M. The multinucleate cells in giant cell granulomas of the jaws are osteoclasts. **Cancer**, v.62, p.1139-45, 1988.

FLETCHER, C.D.M.; UNNI K.K., MERTENS F. **Pathology and Genetics of Tumours of soft tissue and bone- World Health Organization Classification of Tumours**. Lyon: IARC Press, 2002.

FLÓREZ-MORENO, G.A. et al. Cytomorphometric and immunohistochemical comparison between central and peripheral giant cell lesions of the jaws. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.105, n. 5, p. 625- 32, may. 2008.

GALLAGHER, J.C. Advances in bone biology and new treatments for bone loss. **Maturitas**, v.60, p. 65- 9, 2008.

GÜNHAN, M. et al. Estrogen and progesterone receptors in the peripheral giant cell granulomas of the oral cavity. **J Oral Sci**, v.40, n.2, p. 57- 60, 1998.

GÁNDARA REY, J.M. et al. Granuloma periférico de células gigantes: Revisión de 13 casos clínicos. **Med Oral**, v.7, p. 254- 9, 2002.

HOFBAUER, L.C.; HEUFELDER, A.E. Role of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. **J Mol Med**, v.79, p.243-253, 2001.

HOUPIIS, C.H. et al. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP), parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor 1(PTHr1), and MSX1 protein are expressed in central and peripheral giant cell granuloma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 2009. *In press*.

HSU, H. et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. **Proc Natl Acad Sci**, v.96, p.3540-3545, mar, 1999.

HUANG, L. et al. Gene expression of osteoprotegerin ligand, osteoprotegerina and receptor activator of NF- $\kappa$ B in giant cell tumor of bone. **Am J Pathol**, v.156, p.761-7, 2000.

ITONAGA, I. et al. Phenotypic characterization of mononuclear and multinuclear cells of giant cell granuloma of small bones. **J Pathol**, v.198, p.30-36, 2002.

ITONAGA, I. Cellular mechanisms of osteoclast formation and lacunar resorption in giant cell granuloma of the jaws. **J Oral Pathol Med**, v.32, p.224-231, 2003.

IDOWU, B.D. et al. Mutations in the SH3BP2, the gene cherubism, were not detected in central and peripheral giant cell tumours of the jaws. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.46, p. 229-30, 2008.

LACEY, D.L. et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell**, v.93, p.165-76, 1998.

LIM, L.; GIBBINS, J.R. Immunohistochemical and ultrastructural evidence of a modified microvasculature in the giant cell granuloma of the jaws. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.79, n. 2, p.190-8, feb. 1995.

KABAN, L.B. et al. Antiangiogenic therapy with interferon alpha for giant cell lesions of the jaws. **J Oral Maxillofac Surg**, v.60, p.1103-11, 2002.

KABAN, L.B. et al. Adjuvant Antiangiogenic therapy for giant cell tumors of the jaws. **J Oral Maxillofac Surg**, v.65, p.2018-2023, 2007.

KARTSOGIANNIS, V. et al. Localization of RANKL(receptor activator of NFκB ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. **Bone**, v.25, p.525-34, 1999.

KAWASHIMA, N. et al. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.103, n. 5, p.707-11, may. 2007.

KAUZMAN, A. et al. Cyclin alterations in giant cell tumor of bone. **Mod Pathol**, v.16, n.3, p.210-18, 2003.

KAUZMAN, A. et al. Central giant cell granuloma of the jaws: assessment of cell cycle proteins. **J Oral Pathol Med**, v.33, p.170-6, 2004.

KOSLA, S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology**, v.142, p.5050-55, 2001.

KONG, Y-Y et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. **Nature**, v.397, n.28, p.315-23, 1999.

KRUSE-LÖSLER, B et al. Central giant cell granuloma of the jaws: A clinical, radiologic and histopathologic study of 26 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.101, n.3, p.346-54, mar. 2006.

KUMAMOTO, H.; OOYA, K. Peripheral giant cell granuloma: a clinical study of 77 cases from 62 patients and literature review. **J Oral Pathol Med**, v.33, p.46-52, 2004.

KUMAR, V., FAUSTO, N. ABBAS, A. K. **Robbins e Cotran. Bases Patológicas das doenças**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LACEY, D.L. et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell**, v.93, p.165-73, 1998.

LAU, Y.S et al. Phenotypic and molecular studies of giant-cell tumors of bone and soft tissue. **Hum Pathol**, v.36, p.945-54, 2005.

LIETMAN, S.A.; YIN, L.; LEVINE, M.A. SH3BP2 is an activator of NFAT activity and osteoclastogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, v.371, p.644-8, 2008.

LIM, L.; GIBBINS, J.R. Immunohistochemical and ultrastructural evidence of a modified microvasculature in the giant cell granuloma of the jaws. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.79, n.2, p.404-9, feb. 2006.

LIU, B.; YU, S-F.; LI, T-J. Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts. **J Oral Pathol Med**, v.32, p.367-375, 2003.

MENEZES, R. et al. Receptor activator NF- $\kappa$ B-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.102, n.3, p.404-9, sept. 2006.

MIGHELL, A.J; ROBISON, P.A; HUME, WJ. Peripheral giant cell granuloma: a clinical study of 77 cases from 62 patients and literature review. **Oral Dis**, v.1, p.12-19, 1995.

MIGHELL, AJ; ROBISON, PA; HUME, WJ. PCNA and Ki-67 immunoreactivity in multinucleated cells of giant fibroma and peripheral giant cell granuloma. **J Oral Pathol Med**, v.25, p.193-9, 1996.

MORGAN, T. et al. Molecular profiling of giant cell tumor of bone and the osteoclastic localization of Ligand for Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B. **Am J Pathol**, v.167, p.117-28, 2005.

MOTAMEDI, M.S.M.et al. Peripheral and central giant cell granulomas of the jaws: A demographic study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.103, n.6, p.e39-e43,june. 2007.

NEVILLE, B.W. et al. **Patologia Oral & Maxilofacial**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

O'MALLEY, M. et al. Central giant cell granulomas of the jaws: phenotype and proliferation-associated markers. **J Oral Pathol Med**, v.26, p.159-163, 1997.

POGREL, M.A. Calcitonin therapy for central giant cell granuloma. **J Oral Maxillofac Surg**, v.61, p.649-53, 2003.

QUINDERÉ, L.B. et al. Expressão imuno-histoquímica de colágeno IV, tenascina-C e fibronectina em lesões centrais e periféricas de células gigantes. **Rev Inst Cienc Saude**, v.26, n.2, p.226-31, 2008.

RANI, C.S.S.; MACDOUGALL, M. Dental cells express factors that regulate bone resorption. **Mol Cell Biol Res Commun**, v.3, p.145-52, 2000.

REGEZI, J.A.Markers for macrophage and osteoclast lineages in giant cell lesions of the oral cavity- Discussion. **J Oral Maxillofac Surg**, v.55, p.1112-1113, 1997.

REGEZI, J.A. Odontogenic cysts, odontogenic tumors, fibrousseous, and giant cell lesions of the jaws. **Mod Pathol**, v.15, n.3, p.331-341, 2002.

RESNICK, C. M. et al. Maxillofacial and Axial/Appendicular giant cell lesions: Unique tumors or variants of the same disease?- A comparison of phenotypic, clinical and radiographic characteristics. **J Oral Maxillofac Surg**, v.68, p.130-7, 2010.

SAPP, J.P.; EVERSOLE, L.R.; WY SOCK, G.P. Lesões ósseas. IN\_\_\_\_. **Patologia Oral e Maxilofacial contemporânea**. Lourdes: Lusociência, 1999. Cap.4, p.91-128.

SCHOPPET, M.; PREISSNER, K.T.; HOFBAUER, L.C. RANK Ligand and Osteoprotegerin: Paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. **Arteriocler Thromb Vasc Biol**, v.22, p.549-553, 2002.

SHEDDI, M.A., MOSODOMI, H. Central giant cell granuloma of the jaws and giant cell tumor of long bones. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.98, n.2, p.195-6, 2004.

SILVA, T.A. et al. Comparative expression of RANK, RANKL and OPG in keratocystic odontogenic tumors, ameloblastoma and dentigerous cysts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.105, n.3, p.33-41, 2008.

SIMONET, W.S. et al. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell**, v.89, p.309-19, 1997.

SOUZA, P.E.A et al. Immunohistochemical expression of p53, MDM2, Ki-67 and PCNA in central giant cell granuloma and giant cell tumor. **J Pathol Med**, v.28, p.54-8, 1999.

SOUZA, P.E.A; MESQUITA, R.A.; GOMEZ, R.S. Evaluation of p53, PCNA, Ki-67, MDM and AgNOR in oral peripheral and central giant cell lesions. **Oral Dis**, v.6, p.35-39, 2000.

STAVROPOULOS, F.; KATZ, J. Central giant cell granulomas: A systematic review of the radiographic characteristics with the addition of 20 new cases. **Dentomaxillofacial Radiol**, v.31, p.213-7, 2002.

STOLINA, M. et al. Regulatory effects of osteoprotegerin on cellular and humoral immune responses. **Clin Immunology**, v.109, p.347-54, 2003.

SUN, Z-J. et al. Central giant cell granulomas of the jaws: clinical and radiological evaluation of 20 cases. **Skeletal Radiol**, v.38, p.903-9, 2009.

SUSARLA, S.M. et al. CD34 staining density predicts giant cell tumor clinical behavior. **J Oral Maxillofac Surg**, v.67, p.951-6, 2009.

TAY, J.Y.Y. et al. Identification of RANKL in osteolytic lesions of the facial skeleton. **J Dent Res**, v.83, n.4, p.349-53, 2004.

TEILTELBAUM, S.L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v.289, p.1504-8, 2000.

TIFFEE, J.C.; AUFDEMORTE, T.B. Markers for macrophage and osteoclast lineages in giant cell lesions of the oral cavity. **J Oral Maxillofac Surg**, v.55, p.1108-1112, 1997.

TOBÓN-ARROYAVE, S.I. et al. Immunohistochemical expression of RANK, GR $\alpha$  and CTR in central giant cell granuloma of the jaws. **Oral Oncol**, v.41, p.480-88, 2005.

TSUDA, E. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, v.234, p.137-142, 1997.

VERED, M.; BUCHER, A.; DAYAN, D. Giant cell granulomas of the jawbones- a proliferative vascular lesion? Immunohistochemical study with vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. **J Oral Pathol Med**, v.35, p.613-9, 2006a.

VERED, M.; BUCHER, A.; DAYAN, D. Immunohistochemical expression of glucocorticoid and calcitonin receptors as a tool for selecting therapeutic approach in central giant cell granulomas of the jawbones. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.35, p.756-60, 2006b.

VERED, M. et al. Stromal myofibroblasts in central giant cell granuloma of the jaws cannot distinguish between non-aggressive and aggressive lesions. **J Oral Pathol Med**, v.36, p.495-500, 2007.

VERNAL, R. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. **Oral Dis**, v.12, p.283-9, 2006.

WAGNER, E.F.; KARSENTY, G. Genetic control of skeletal development. **Curr Opin Genet Dev**, v.5, p.527-32, 2001.

YASUDA, H. et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. **Proc Natl Acad Sci**, v.95, p.3597-3602, mar, 1998.



## ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

## PARECER Nº 138/2008

Prot. nº	074/08 – CEP-UFRN
CAAE	0084.0.051.000-08
Projeto de Pesquisa	Marcação Imuno-histoquímica da proliferação celular e fatores de reabsorção óssea em lesões centrais e periféricas de células gigantes
Área de Conhecimento	Ciências da Saúde – Odontologia – Grupo III
Pesquisador Responsável	Antônio de Lisboa Lopes da Costa
Instituição Onde Será Realizado	Departamento de Odontologia - UFRN
Instituição Sediadora	Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral
Finalidade	Doutorado
Período de realização	Início: agosto de 2008 Término: julho de 2009
Revisão Ética em	01 de agosto de 2008

## RELATO

## 1. RESUMO

**Objetivo Geral:** verificar se o comportamento biológico distinto entre as lesões de células gigantes centrais e periféricas pode ser devido diferenças nos fatores de reabsorção óssea nessas lesões, bem como se existe diferença na atividade proliferativa entre as mesmas. **Metodologia:** o estudo envolverá 60 participantes adultos (30 homens e 30 mulheres) que tenham espécimes emblocados em parafina, arquivados no banco de espécimes da Patologia Oral/DOD/UFRN, com diagnóstico histopatológico de lesões centrais e periféricas de células gigantes. Serão efetuados estudos: morfológico e Imuno-histoquímico. Os resultados serão analisados através do software SPSS. **Riscos e Benefícios:** o estudo é de risco mínimo.

## 2. ENTENDIMENTOS

**Avaliação ética e metodológica:** todos os itens metodológicos e éticos foram corretamente apresentados.

## 3. PARECER

Isso posto, o protocolo em pauta foi enquadrado como **PROTOCOLO APROVADO**.

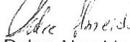
## 4. ORIENTAÇÕES AO PESQUISADOR

Em conformidade com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) através do Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa (Brasília, 2002) e Resol. 196/96 – CNS o pesquisador responsável deve:

1. entregar ao sujeito da pesquisa uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), na íntegra, por ele assinada (Resol. 196/96 – CNS – item IV.2d);
2. desenvolver a pesquisa conforme foi delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após a análise das razões da descontinuidade pelo CEP/UFRN (Resol. 196/96 – CNS – item III.3z);
3. apresentar ao CEP/UFRN eventuais emendas ou extensões ao protocolo original, com justificativa (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa – CONEP – Brasília – 2002 – p.41);
4. apresentar ao CEP/UFRN relatório final após conclusão da pesquisa - (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa - CONEP – Brasília – 2002 – p.65);

Os formulários para os Relatórios Parciais e Final estão disponíveis na página do CEP/UFRN ([www.etica.ufrn.br](http://www.etica.ufrn.br)).

Natal, 12 de agosto de 2008.

  
Dulce Almeida  
COORDENADORA DO CEP-UFRN









# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)