

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**MODALIDADE ARTIGO(S) CIENTÍFICO(S)**

**EXPRESSÃO DE REGULADORES DA REABSORÇÃO ÓSSEA  
(RANK/ RANKL/ OPG) E FORMAÇÃO ÓSSEA (OSTEOCALCINA)  
EM LESÕES RELACIONADAS AO OSSO E OSTEOSSARCOMA**

**Dissertação de Mestrado**

**ALUNA: Larissa Santana Arantes Elias  
ORIENTADOR: Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça**

**Goiânia  
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**MODALIDADE ARTIGO(S) CIENTÍFICO(S)**

**EXPRESSÃO DE REGULADORES DA REABSORÇÃO ÓSSEA  
(RANK/ RANKL/ OPG) E FORMAÇÃO ÓSSEA (OSTEOCALCINA)  
EM LESÕES RELACIONADAS AO OSSO E OSTEOSSARCOMA**

Dissertação de Mestrado apresentado  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Odontologia da Universidade Federal  
de Goiás para obtenção do Título de  
Mestre em Odontologia

**ALUNA: Larissa Santana Arantes Elias  
ORIENTADOR: Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça**

**Goiânia  
2010**

## **BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aluna: Larissa Santana Arantes Elias**

---

**Orientador: Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça**

### **Membros:**

**Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Carvalho Batista**

**Prof<sup>a</sup>. Dr. João Alves de Araújo Filho**

### **Suplente:**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler**

**Curso de Pós-Graduação em Odontologia  
da Universidade Federal de Goiás**

**Data: 19 de março de 2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**GPT/BC/UFG**

Elias, Larissa Santana Arantes.

Expressão De Reguladores Da Reabsorção Óssea (Rank/  
Rankl/ Opg) E Formação Óssea (Osteocalcina) Em Lesões  
Relacionadas Ao Osso E Osteossarcoma [manuscrito] /  
Larissa Santana Arantes Elias. - 2010.

Xiii, 57 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Elismauro Francisco de Medonça

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal  
de Goiás, Faculdade de Odontologia, 2010.

Bibliografia

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Anexos.

1. Lesões relacionadas ao osso. 2. Reabsorção Óssea. 3.  
Formação Óssea. I. Título.

## ***Dedico este trabalho...***

*Aos meus pais, Marlene e Esdras: meu porto seguro, razão do meu viver;*

*À minha irmã Natália e minha avó Anete: pelo apoio incondicional e amor dedicado a mim;*

*Ao meu namorado Luiz Carlos: companheiro de todas as horas, amor verdadeiro;*

*E a Deus pelo que tenho de mais precioso, a vida.*

# Agradecimentos

---

Ao meu orientador, Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça, a quem devo muitos agradecimentos. Agradeço pela orientação, incentivo, apoio, aprendizado proporcionado e, sobretudo, por acreditar no meu potencial. Muito do que sou e do que serei como profissional se deve aos seus ensinamentos;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Carvalho Batista agradeço por tudo: colaboração, incentivo e ensino. Obrigada;

Aos professores Cláudio Rodrigues Leles, Maria Alves Garcia Santos Silva, Carlos Estrela e Rejane Faria Ribeiro-Rotta, meus sinceros agradecimentos;

Aos colegas de mestrado Karla, Karine, Helenisa, Inara, Eduardo, Lila, Paula, Daniela, Érika, Antônio Hélio, Leandro, Evelin, Andréia, Andrea, Geovane, Henrique, pelo companheirismo nas horas difíceis e pela amizade e alegria proporcionados nesse período; em especial as minhas eternas amigas, Angélica e Nádia pelo apoio, compreensão, paciência, pelas risadas que demos juntas, ou seja, por tudo;

Aos colegas da graduação Rafael e Marco Aurélio que tiveram uma contribuição fundamental na realização deste trabalho; e ao Germano pela amizade. Obrigada por tudo;

À funcionária do CGDB, Claudinha, e ao funcionário do Laboratório de Patologia Bucal, Erildo, pelo apoio, sem o qual tudo teria sido mais difícil;

Aos colegas Clóvis Martins, Marcel Garrote e Yussif Mamede pela colaboração na coleta de material realizada durante as cirurgias. Meu agradecimento sincero pela compreensão e paciência;

Aos colegas do Cais Jardim Novo Mundo pela colaboração e apoio nessa fase tão importante. Em especial, à Mariel Soares pelo socorro nas horas em que mais precisei;

À toda minha família, mas principalmente à: meus afilhados Matheus e Letícia, e as outras crianças da família: Maria Gabriela, João Felipe e Cauã, por acrescentarem razão e beleza aos meus dias; e a minha tia Elba Nara que nos deixou precocemente e não pode assistir a concretização de mais uma etapa importante em minha vida;

A Deus, por ser meu apoio constante em todas as etapas da minha vida.

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve, e a vida é muito bela para ser insignificante...”*

Charles Chaplin



# Sumário

---

SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT .....	xiii
1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
5. PUBLICAÇÃO .....	35
6. CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
8. ANEXOS.....	46

# Siglas, símbolos e abreviaturas

---

<b>BRL</b>	Bone Related Lesions
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Cálcio
<b>CGCL</b>	Central Giant Cell Lesion
<b>CGDB</b>	Centro Goiano de Doenças da Boca
<b>COA</b>	Cisto Ósseo Aneurismático
<b>COS</b>	Cisto Ósseo Simples
<b>DF</b>	Displasia Fibrosa
<b>FD</b>	Fibrous Dysplasia
<b>FO</b>	Fibroma Ossificante
<b>FO/UFG</b>	Faculdade de Odontologia/Universidade Federal de Goiás
<b>FOL</b>	Fibro-Osseous Lesions
<b>LCCG</b>	Lesão Central de Células Gigantes
<b>LFO</b>	Lesões Fibro-Ósseas
<b>LRO</b>	Lesões Relacionadas ao Osso
<b>M-CSF</b>	Macrophage-Colony Stimulating Factor
<b>OC</b>	Osteocalcina/Osteocalcin
<b>OF</b>	Ossifying Fibroma

<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OPG</b>	Osteoprotegerina/Osteoprotegerin
<b>OS</b>	Osteossarcoma/Osteosarcom
<b>P</b>	Probabilidade
<b>RANK</b>	Receptor activator of nuclear factor (NF)-kB
<b>RANKL</b>	Receptor activator of nuclear factor (NF)-kB Ligand
<b>SBC</b>	Simple Bone Cyst
<b>TNF</b>	Tumour Necrosis Factor
<b>TNFR</b>	Tumour Necrosis Factor Receptor
<b>TRAF</b>	TNF Receptor-Associated Factor
<b>WHO</b>	World Health Organization

# Lista de tabelas

---

**TABELA 1** Características clínicas, radiográficas e histopatológicas das lesões relacionadas ao osso (LRO's) e osteossarcoma (OS).

**TABELA 2** Anticorpos utilizados

## Resumo

---

O sistema RANK (receptor activator of nuclear factor Kappa-Beta)-RANKL (receptor activator of nuclear factor-kappa beta ligand)-OPG (osteoprotegerin) constitui uma das principais vias de diferenciação e ativação dos osteoclastos e alterações nessa via tem sido associadas a diversas lesões relacionadas ao osso (LRO), benignas e maligna como no osteossarcoma (OS). Esse sistema quando desregulado induz reabsorção, e no caso das LROs, através da substituição do tecido ósseo por um tecido fibroso com a presença de várias formas de ossificação. E nesse contexto outra proteína, a osteocalcina (OC), que é um marcador tardio de ossificação, desempenha um papel fundamental no diagnóstico destas lesões. Portanto, o objetivo do presente estudo foi identificar, quantificar e comparar células RANK<sup>+</sup>, RANKL<sup>+</sup>, OPG<sup>+</sup> e OC<sup>+</sup> em lesões dos maxilares com envolvimento ósseo: fibroma ossificante (FO), displasia fibrosa (DF), cisto ósseo simples (COS), lesão central de células gigantes (LCCG) e osteossarcoma (OS). As células RANK<sup>+</sup>, RANKL<sup>+</sup>, OPG<sup>+</sup> e OC<sup>+</sup> foram identificadas pela técnica da imunohistoquímica, método da imunoperoxidase e do polímero, em 10 amostras de FO, DF, COS, LCCG e 5 amostras de OS. Quando comparado as lesões entre si, tanto nas células fibroblásticas estromais quanto da matriz óssea, nossos resultados demonstraram que os ativadores da reabsorção óssea (RANK/RANKL) apresentam uma maior expressão no FO e LCCG e, o inibidor da reabsorção (OPG) e a OC apresentaram maior na DF e COS. Em adição, nossos achados revelam que o OS apresenta alta expressão de todas as proteínas avaliadas, quando comparadas àquelas das LROs. Todavia, uma maior expressão de RANKL em relação à OPG e OC foi evidenciada nesta neoplasia. Nossos resultados sugerem que o FO, a LCCG e o OS expressam reguladores do metabolismo ósseo que podem estar relacionados com a reabsorção óssea aumentada nessas lesões, sendo que na DF e no OS foi observado envolvimento osteoblástico.

# Abstract

---

The RANK (receptor activator of nuclear factor Kappa-Beta)-RANKL (receptor activator of nuclear factor-kappa beta ligand)-OPG (osteoprotegerin) system is the principal means of differentiating and activating osteoclasts. Changes along this path have been associated with various bone related lesions (BRL), whether benign or malignant, such as osteosarcoma (OS). This system induces resorption when it is deregulated, and in the case of LROs, by replacing the bone tissue for fibrous tissue with the presence of various forms of ossification. And in this same context another protein, osteocalcin (OC), a marker of late ossification, plays a key role in the diagnosis of these lesions. This being so, the objective of this study was to identify, quantify and compare cell RANK<sup>+</sup>, RANKL<sup>+</sup>, OPG<sup>+</sup> and OC<sup>+</sup> in lesions of the jaw with bone involvement: ossifying fibroma (OF), fibrous dysplasia (FD), simple bone cysts (SBC), central giant cell lesions (CGCL) and osteosarcoma (OS) so as to contribute to understanding the pathogenesis and establishing the diagnosis of these lesions. RANK<sup>+</sup>, RANKL<sup>+</sup>, OPG<sup>+</sup> and OC<sup>+</sup> cells were identified by the technique of immunohistochemistry, a method of immunoperoxidase and polymer, in 10 samples of OF, FD, SBC, CGCL and 5 samples of OS. Our results showed that all samples were positive for RANK, RANKL, OPG and OC. In the stromal fibroblast-like cells, the OF (P<0.001), CGCL (P=0.007) and OS (P=0,058) presented a greater expression of RANKL than OPG, in contrast with both the SBC (P=0.003) and the FD (P<0.001). As for bone-matrix (cells around bone/osteoid-osteoblast and osteoclast), the OS (P=0.24) and OF (P=0.001) samples demonstrated a higher RANKL immunoreactivity and a lower in FD (P=0.001) and SBC (P=0.4) samples. In terms of OC, a higher expression was shown in FD, SBC, and OS (P=0.008). Our results suggest that OF, CGCL and OS express bone metabolism regulators, which may be related to increased bone resorption in these lesions. In addition, osteoblastic involvement was seen in FD and OS.

# 1. Caracterização do problema

Lesões fibro-ósseas (LFOs) denominam um grupo de alterações que afetam os ossos maxilares e craniofaciais sendo caracterizadas pela substituição do tecido ósseo normal por um tecido fibroso que contém variadas formas de ossificação.<sup>1,45,48,61</sup>

De acordo com a classificação de tumores odontogênicos da Organização Mundial de Saúde (OMS) as LFOs já receberam inúmeras classificações ao longo do tempo.<sup>1</sup> Na primeira edição, de 1971, esse grupo de lesões foi classificado em cementomas (cementoblastoma benigno, fibroma cementificante, displasia cemento-periapical e cementoma gigantiforme) e neoplasmas e outros tumores relacionados ao osso (displasia fibrosa e fibroma ossificante).<sup>46</sup> Em 1992, na segunda edição, o termo cementoma foi eliminado e as lesões fibroma cementificante, displasia cemento-periapical e cementoma gigantiforme foram reclassificadas e incluídas na categoria das neoplasias odontogênicas, e as demais lesões não foram consideradas neoplasias, mas sim lesões relacionadas ao osso.<sup>27</sup> Já na última edição de 2005 as LFOs foram inseridas no grupo das lesões relacionadas ao osso (LRO) que inclui fibroma ossificante (FO), displasia fibrosa (DF), displasias ósseas, querubismo, cisto ósseo aneurismático (COA), cisto ósseo simples (COS) e lesão central de células gigantes (LCCG).<sup>3</sup>

Mais de 70% das LROs ocorrem na região de cabeça e pescoço<sup>1</sup>, sendo que no complexo maxilofacial as LROs apresentam características clínico-patológicas e radiográficas diferentes das lesões encontradas em outros ossos do esqueleto. Na maioria dos casos não é fácil o estabelecimento do

diagnóstico das LROs que acometem a mandíbula e maxila<sup>1</sup>, uma vez que constituem um grupo de lesões com características clínicas diversas, mas com padrão microscópico muito similar (Tabela 1).<sup>48</sup> O diagnóstico final, portanto, somente pode ser estabelecido por meio de uma análise conjunta dos achados clínicos, histopatológicos e radiográficos.<sup>1</sup>

Do ponto de vista morfológico as lesões conhecidas como LFOs são geralmente caracterizadas por alguns componentes, entre os quais, a presença de um estroma constituído por tecido conjuntivo contendo células de densidade variável e com a produção de um componente mineralizado, variando de tecido ósseo a estruturas esféricas denominadas de cementículos.<sup>35</sup>

As características histológicas descritas sugerem fortemente que o principal processo envolvido é o acelerado remodelamento ósseo, considerando que o tecido ósseo é submetido, durante toda a vida, a uma contínua renovação.<sup>35</sup> As LROs apresentam como característica fundamental uma diferença com relação ao potencial de comprometimento ósseo, correlacionada, portanto, com o comportamento biológico destas lesões.

Outra lesão que também apresenta comprometimento ósseo, mas não se enquadra no grupo das LROs é o sarcoma osteogênico, também, denominado osteossarcoma (OS), no qual, segundo a OMS é classificado no grupo dos tumores malignos do osso e cartilagem.<sup>3</sup> Essa lesão deve ser incluída no diagnóstico diferencial por se tratar de uma lesão com alto potencial osteoblástico no qual as células neoplásicas produzem osso ou osteóide e com capacidade de invasão do tecido ósseo normal (Tabela 1).<sup>3</sup>



Tabela 1: Características clínicas, radiográficas e microscópicas das LROs e osteossarcoma.<sup>3</sup>

	<b>Etiologia</b>	<b>Clínicas</b>	<b>Radiográficas</b>	<b>Histopatológicas</b>
Fibroma Ossificante	Desconhecida	Crescimento lento, indolor e contínuo; idade entre 20 a 40 anos	Lesão unilocular, características mistas; bordas bem definidas.	Esférulas/trabéculas de osteóide em um denso estroma moderadamente celular
Displasia Fibrosa	Mutação genética	Crescimento unilateral e assintomático; idade média de 20 anos	Opacificação anormal, mal-definida, com característica de “vidro fosco”.	Tecido celular fibroso composto por trabeculado de tecido ósseo de formato semelhante ao dos caracteres chineses
Cisto Ósseo Simples	Desconhecida ou relacionada a trauma ou alterações da circulação local	Assintomática, região posterior da mandíbula e pacientes com menos de 20 anos	Lesão radiolúcida, expansão óssea, envolvimento ou não da cortical óssea	Espaços preenchidos por sangue em um estroma fibroso ou a presença de uma cavidade vazia
Lesão Central de Células Gigantes	Neoplasia benigna	Lesão osteolítica agressiva; entre a 2ª e 3ª década de vida	De pequenas lesões uniloculares a grandes lesões multiloculares	Presença de grupos de células gigantes em um estroma fibroblástico
Osteossarcoma	Relacionada com fatores predisponentes (radioterapia prévia, doença de Paget, retinoblastoma)	Lesão maligna; entre a 3ª e 4ª décadas de vida	Padrão lítico, mas pode ser esclerótico ou misto	Estroma maligno, indiferenciado, produzindo osteóide ou osso neoplásico

O comprometimento do tecido ósseo por lesões benignas ou malignas afeta o balanço entre a reabsorção e aposição óssea.<sup>64</sup> Em alguns casos o desenvolvimento da lesão leva a osteogênese sem a presença de osteólise, sendo que em outras circunstâncias ocorrerá a presença de osteólise focal ou difusa levando a reabsorção de uma grande área.<sup>64</sup> Portanto, o conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares da biologia óssea é crucial tanto para a ciência básica como para a perspectiva clínica, através da compreensão da

patogênese e, portanto, com a possibilidade de introdução de novas modalidades terapêuticas para o tratamento dessas lesões com envolvimento ósseo.<sup>19,65</sup>

Controvérsias quanto à nomenclatura, classificação, patogênese e diagnóstico dificultam a seleção da terapia adequada e determinam a importância do conhecimento da biologia óssea, e especificamente sobre os fenômenos de reabsorção e substituição óssea das LROs e OS.<sup>35</sup>

O metabolismo do tecido ósseo é um evento fisiológico altamente coordenado entre a formação óssea pelos osteoblastos e a reabsorção óssea através dos osteoclastos.<sup>24,26,31,32,57,59,65</sup> Os osteoclastos são derivados de células precursoras hematopoiéticas da linhagem de monócitos/macrófagos<sup>24,31,39</sup> e apresentam uma importante função imunomoduladora em estágios patológicos e também podem regular a função osteoblástica através da diferenciação dos timócitos e precursores das células B<sup>6,26</sup>; já os osteoblastos são provenientes de células mesenquimais não diferenciadas<sup>21,26</sup>, o progenitor comum de condrócitos, mioblastos e adipócitos<sup>21</sup> e estão envolvidos não somente no processo de formação óssea, mas, também, na regulação da atividade osteoclástica<sup>33,35,56</sup> e da mineralização óssea.<sup>55</sup>

A remodelação óssea fisiológica tem a função principal de manutenção da homeostasia dos íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a nível intracelular.<sup>4</sup> É iniciada pelo recrutamento, formação e ativação de osteoclastos.<sup>24,31,32,65</sup> Essas células reabsorvem um volume de osso e subsequentemente a lacuna de reabsorção

(Lacuna de Howship's) é preenchida com um novo osso formado por osteoblastos recrutados e ativados.<sup>31,32,37,65</sup>

## 1.1 Reabsorção óssea

Uma das principais vias de proliferação, diferenciação e ativação dos osteoclastos é o sistema RANK (receptor activator of nuclear factor NF- $\kappa$ B)/RANKL(receptor activator of nuclear factor NF- $\kappa$ B Ligand)/OPG (osteoprotegerin).<sup>4,7,19,24,26,29,31,53,58,59</sup>

O RANKL é uma molécula que pode ser transmembrana ou secretada, pertencente à família do Tumour Necrosis Factor (TNF).<sup>5,24</sup> É secretada por células T ativadas e expressa por células estromais, osteoblastos, osteoclastos, células periosteais mesenquimais, condrócitos, células epiteliais mamárias e células endoteliais.<sup>6,7,19,29,31,58,59,66,32,65</sup> A ação do RANKL pode ocorrer através do contato célula a célula, na sua forma transmembrana, ou pode ser clivada e interagir com o seu receptor como um ligante solúvel.<sup>6,66</sup> Essa molécula é importante para a diferenciação completa das células hematopoiéticas progenitoras em osteoclastos maduros e exerce seus efeitos por meio de sua ligação ao receptor RANK<sup>7,24,29,31,49,53,58,59,65,66</sup>, sendo responsável também pela ativação e sobrevivência de osteoclastos, bem como pela sua aderência ao osso.<sup>7,19,29,31,66</sup>

Além do papel na reabsorção óssea, a molécula RANKL desempenha outros papéis no sistema imune no qual a expressão por células T ativadas age como um fator de sobrevivência para células dendríticas e é essencial para a organogênese linfonodal e diferenciação linfocitária, bem como estimula a angiogênese e sobrevivência das células endoteliais.<sup>5,25,26</sup>

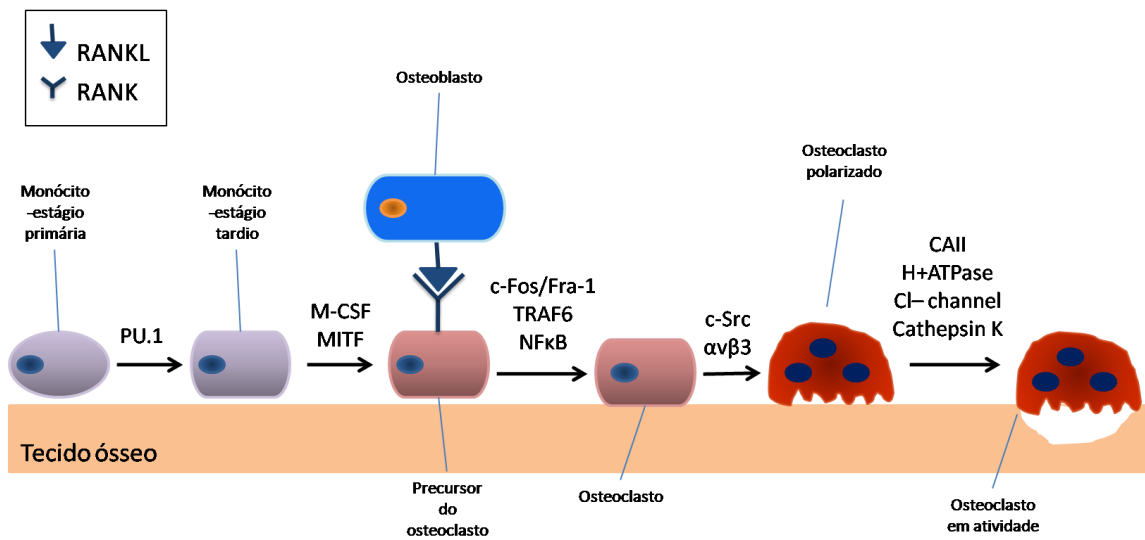
O RANK é uma proteína transmembrana tipo I, receptor membro da super família de receptores TNF-Tumour Necrosis Factor Receptor (TNFR)<sup>24,31,32,34,49,55,65</sup>, expressa principalmente em precursores de osteoclastos, osteoclastos, linfócitos T e B e células dendríticas.<sup>6,31,32,34,49,55,65</sup>

Por outro lado, a osteoclastogênese é bloqueada na presença da OPG, um receptor solúvel que ao se ligar ao RANKL impede a sua ligação ao seu receptor RANK, inibindo assim a diferenciação de osteoclastos<sup>7,19,24,26,31,49,63,65</sup> ou reduzindo a meia-vida do RANKL membranoso.<sup>42</sup> A OPG é expressa em muitos tecidos além dos osteoblastos, incluindo tecido cardíaco, rim, fígado, baço e medula óssea.<sup>6</sup> Desta maneira, o balanço entre os níveis de RANKL e OPG regula a ativação ou inibição de osteoclastos e conseqüentemente modula o processo de reabsorção óssea.<sup>7,24,29,49,53,58,59,66</sup> A OPG também é responsável pela sobrevivência das células endoteliais, apresentando um importante fator protetor no sistema vascular.<sup>19,25,49</sup>

Além da ligação do RANK ao RANKL, é requerida também a ativação de vários sinais intracelulares com o intuito de promover a proliferação, ativação e sobrevivência de macrófagos/osteoclastos.<sup>4,24,55,58,59</sup> Primeiramente, a ativação do gene PU.1 é realizada para que haja a maturação dos monócitos precursores de osteoclastos. Imediatamente, a ligação do fator estimulante da colônia de macrófagos, Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF), com o seu receptor c-fms e a ativação do fator de transcrição MITF são responsáveis pela proliferação dos pré-osteoclastos. Após a ligação RANK-RANKL vários outros fatores de transcrição e moléculas serão ativados (Figura 1).<sup>4,24,31,32,47,58</sup>

Para a completa maturação do pré-osteoclasto é indispensável a ativação dos fatores de transcrição c-Fos/Fra-1 e NFκB (p50 e p52) e das

proteínas associadas ao TNFR (TRAF6)<sup>4,24,25,31,32,55</sup> (Figura 1), sendo dependente da elevação, induzida pelo RANK, de  $Ca^{2+}$  intracelular.<sup>4,24,31,32,55,58</sup>



**Figura 1:** Desenho esquemático ilustrando a via essencial da osteoclastogênese. Desenho modificado de: Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic Regulation Of Osteoclast Development And Function. Nature 2000; 4:638-49<sup>58</sup>.

Além da diferenciação das células osteoprogenitoras é imprescindível a união dos osteoclastos à matriz óssea extracelular na zona selada, que ocorre na presença de anéis de actina F mediados pela integrina  $\alpha_v\beta_3$ .<sup>4,32,58,59</sup> A ativação dessa integrina provoca mudanças no  $Ca^{2+}$  intracelular e ativação de c-Src e c-src (Figura 1).<sup>32,58</sup>

Após a ligação dos osteoclastos à matriz óssea inicia-se a reabsorção óssea propriamente dita. A reabsorção óssea, portanto, envolve mecanismo de dissolução dos cristais de hidroxiapatita e degradação enzimática das proteínas da matriz óssea.<sup>4,32,58,59</sup> Esse processo é iniciado pela secreção de prótons mediados por um tipo vacuolar de  $H^+$ -ATPase, na lacuna de reabsorção de Howship.<sup>4,32,58,59</sup> O sistema RANK também contribui para a reabsorção óssea através da indução da expressão da catepsina K, uma cisteína proteinase,

produzida por osteoclastos ativados e envolvidos na solubilização da matriz óssea (Figura 1).<sup>4,12,58,59</sup>

Dessa forma, alterações nos níveis de RANKL-OPG têm sido associadas ao processo de reabsorção óssea observado em diferentes patologias<sup>50,63</sup>, tais como a artrite reumatóide, osteopetrose, osteoporose pós-menopausa, doenças periodontais e anormalidade na erupção dentária.<sup>7,12,13,19,26,33,50,54,53,56</sup>

Com a caracterização do RANK-RANKL e OPG, alguns estudos têm verificado que as sínteses dessas citocinas, também, se encontram alteradas em patologias osteolíticas malignas, como o mieloma múltiplo, onde uma alta expressão de RANKL e baixa de OPG desempenham um importante papel na destruição óssea associada a esse tumor.<sup>16</sup> Outro fato extremamente relevante é a associação de metástase óssea, em cânceres de mama e próstata, com anormalidades no sistema RANK/RANKL/OPG.<sup>5,8,19</sup>

Entretanto, em lesões ósseas dos maxilares, até o presente momento, poucos estudos<sup>2,14,22,28,33,52,54,57,60</sup> foram realizados com o intuito de caracterizar o sistema de citocinas reguladoras da reabsorção óssea (RANK, RANKL e OPG) de forma comparativa.

Inicialmente, a expressão de OPG e RANKL foi detectada em odontoblastos, ameloblastos, células pulpares e células do ligamento periodontal e a molécula RANKL também foi identificada em cistos dentígeros e radiculares e granulomas apicais.<sup>39,47,54,57,62</sup>

Sandra e colaboradores<sup>52</sup> (2005) avaliaram, através de ELISA, o potencial e o mecanismo do ameloblastomas na indução da osteoclastogênese, sendo que foi observado que o ameloblastoma expressa e

secreta RANKL podendo estar envolvido na reabsorção óssea, corroborando com os resultados encontrados por Kumamoto e colaboradores<sup>28</sup> (2004) no qual a análise do RANKL foi realizado através de imunistoquímica e RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa). De forma semelhante, Tay e colaboradores<sup>57</sup> (2004) em amostras de ameloblastomas, cistos dentígeros, tumor odontogênico queratocístico e cistos radiculares demonstraram a presença de RANKL pela imunistoquímica, sugerindo, desta maneira, o importante potencial dessa citocina na reabsorção óssea em lesões ósseas dos maxilares.

Dados publicados recentemente por Silva e colaboradores<sup>54</sup> avaliaram comparativamente a expressão dos reguladores da reabsorção óssea (RANK/RANKL/OPG) em tumores odontogênicos com grande capacidade osteolítica, tais como ameloblastomas e tumores odontogênicos queratocísticos, através de imunistoquímica. Como resultado, foi observado, no epitélio, uma expressão similar de RANK, RANKL e OPG em todas as amostras. Diferentemente ao encontrado no epitélio, no estroma o número de células RANK e RANKL positivas foi maior no ameloblastoma multicístico quando comparado com as amostras de cistos dentígeros, sendo que a maioria dos ameloblastomas multicísticos e unicísticos apresentaram maior expressão de células RANKL<sup>+</sup> do que OPG<sup>+</sup>, ao contrário do que foi encontrado nos tumores odontogênicos queratocísticos e cistos dentígeros. Os resultados, portanto, indicaram uma diferença da expressão de RANK/RANKL/OPG nos tumores odontogênicos epiteliais, podendo contribuir na diferença da atividade osteolítica dessas lesões e indicando um maior potencial osteolítico nos ameloblastomas sólido/multicístico.<sup>54</sup>

Na mesma linha de pesquisa do estudo de Silva et al<sup>54</sup>, o estudo realizado por Andrade et al<sup>2</sup> avaliou as moléculas reguladoras da reabsorção em tumor odontogênico epitelial calcificante (tumor de Pindborg), tumor odontogênico cístico calcificante, tumor odontogênico adenomatóide, fibroma ameloblástico e mixoma odontogênico. Os resultados encontrados demonstraram que todas as lesões tiveram imunoreatividade para RANK, RANKL e OPG e a quantificação desses mediadores revelou um padrão similar de expressão, sendo que nos tumores odontogênico adenomatóide e odontogênico cístico calcificante mostraram um maior conteúdo de OPG do que de RANKL. Esses resultados sugerem que a imunoreatividade positiva para as proteínas da reabsorção óssea podem modular localmente a reabsorção óssea associada ao tumor.<sup>2</sup>

Todavia, até o presente momento, há somente uma investigação na literatura que tenham identificado o RANK, RANKL e OPG em LROs, tais como a LCCG, DF, COA, COS e FO.<sup>14</sup> Good e colaboradores<sup>14</sup>, em 2002, identificaram e quantificaram a expressão da molécula RANKL, por imunohistoquímica, em amostras de fibroma não ossificante, cisto ósseo aneurismático, tumor de células gigantes, tumores ósseos malignos primários e metástase óssea de mieloma múltiplo, células renais pequenas, entre outros. Os resultados demonstraram que as lesões analisadas apresentaram expressão positiva para RANKL, com exceção dos casos de melanoma e nas metástases ósseas de mama.<sup>14</sup>

Recentes estudos<sup>22,33,60</sup> também indicam que as células gigantes presentes nas LCCG's apresentam características semelhantes às dos osteoclastos e que a diferenciação osteoclástica nessa lesão é conduzida pelo



mecanismo do RANK/RANKL/OPG. Tobón-Arroyave e colaboradores (2005) avaliaram a expressão da molécula RANK, também por imunistoquímica, em LCCGs e demonstraram uma imunoreatividade variando de moderada a intensa no citoplasma e freqüentemente na membrana nuclear das células gigantes multinucleadas, células endoteliais e células estromais mononucleares, enquanto, células estromais fusiformes apresentaram imunoreatividade negativa.<sup>60</sup>

No caso de lesões malignas relacionadas ao osso, como o OS, recentes estudos tem demonstrado um papel crucial, da expressão do RANK na atividade osteolítica dessas lesões. Entretanto, não há uma determinação específica da expressão de RANKL nas células do OS humano<sup>41</sup>; e também foi verificado que a molécula OPG impede a formação de lesões osteolíticas amplas associadas com o desenvolvimento de OS, bem como influencia o crescimento local do tumor.<sup>30</sup>

Tomando como base a descoberta e caracterização das moléculas RANK-RANKL-OPG e a identificação do seu papel na patogênese da perda óssea tem-se justificado o desenvolvimento de drogas com propriedade de modular a osteoclastogênese induzida pelo RANK.<sup>11,54,65</sup>

## 1.2 Formação óssea

Para compreensão do processo de remodelação óssea não somente a reabsorção deve ser avaliada, mas também o processo de formação óssea.. A osteoblastogênese consiste em três fases: na primeira fase ocorre a perda da capacidade de diferenciação multipotente pelas células mesenquimais prematuras; a segunda fase é caracterizada pela produção ativa

de proteínas da matriz óssea e a terceira fase envolve a mineralização da matriz óssea (calcificação).<sup>42</sup>

Dessa forma, o colágeno Tipo I e a fosfatase alcalina são marcadores moleculares do estágio inicial de diferenciação osteoblástica. Por outro lado a osteocalcina (OC), que é uma proteína específica da matriz óssea e sua posterior mineralização são marcadores moleculares do estágio tardio da diferenciação osteoblástica, assim como os marcadores osteonectina, osteopontina e sialoproteína óssea.<sup>10</sup>

A OC, uma proteína da matriz óssea, se liga ao  $\text{Ca}^{2+}$  e pode promover calcificação dessa matriz.<sup>20,23</sup> Como sua expressão segue a fase proliferativa da diferenciação osteoblástica é considerada um marcador de osteoblastos maduros.<sup>20,23</sup> O papel fisiológico da OC não está precisamente compreendido, mas tem sido postulado que essa molécula desempenha, além da atuação na formação óssea, um papel fundamental no recrutamento osteoclástico e na reabsorção óssea<sup>4,51</sup>, apresentando, portanto, a característica de modular a formação óssea exagerada, sendo considerada um regulador negativo da formação óssea.<sup>20</sup>

A ação da OC ocorre através da presença de vários resíduos de ácido gama-carboxiglutâmico que aumentam a capacidade dessa proteína se ligar aos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e promove, portanto, sua adsorção em hidroxiapatita.<sup>44</sup>

Muitos processos patológicos como DF, OS e outras lesões que produzem osteóide podem ser derivados de progenitores osteoblásticos.<sup>20</sup> Hopyan e colaboradores (1999) demonstraram que todos os espécimes analisados de DF expressam OC e em 60% dos casos a expressão foi comparável com o osso normal, sugerindo que as células da DF são

notoriamente diferenciadas juntamente a linhagem osteoblástica.<sup>20</sup> Foi observado também que a ausência de OC na maioria dos casos de OS indica que a ossificação nessas lesões não requer OC.<sup>20</sup>

A OC também foi avaliada em cultura de células de DF que possuíam a mutação gênica específica dessa lesão e foi observado que as células osteoblásticas apresentavam menor expressão de OC quando comparada com células normais do mesmo paciente, indicando que a proliferação aumentada de células osteoblásticas mutadas estava associada com uma baixa diferenciação celular.<sup>36</sup>

A comparação da OC entre a DF e a displasia osteofibrosa, tanto na matriz óssea quanto nas células fibroblásticas, mostrou maior expressão na DF sugerindo que a matriz óssea nessa lesão é mais madura e que as células fibroblásticas apresentam características fenotípicas das células osteoprogenitoras.<sup>51</sup> Diferentemente, a análise da OC em amostras de FO e fibroma ossificante periférico revelou reação positiva em células fibroblásticas e tecido ósseo em ambas as lesões, mas nenhuma quantificação foi realizada.<sup>43</sup>

Corroborando com estudos apresentados anteriormente<sup>43,51</sup>, quando foi realizada a comparação da OC em amostras de DF e FO foi observada maior expressão dessa proteína na DF, sugerindo que o material calcificado na DF é mais similar ao osso normal do que no FO, apresentando diferenças quanto à formação óssea e diferenciação osteoblástica.<sup>61</sup>

Em lesões compostas por células gigantes, como a Lesão Central de Células Gigantes, foi possível observar que tanto as células gigantes como as células estromais foram negativas para a OC, quando analisadas por método

imunoistoquímico, mas positivas quando analisadas em nível de RNAm (RNA mensageiro).<sup>21,42</sup>

Estudo realizado em 1995, por Park e colaboradores<sup>44</sup>, avaliou a presença de OC em amostras de algumas LROs e observou que a maioria dos casos de OS, 83% dos casos de lesões centrais de células gigantes foram imunoreativos para essa proteína, sendo que os casos de COA foram negativos para a OC.<sup>44</sup> Os resultados encontrados, portanto, são de extrema relevância para a promoção do diagnóstico final entre lesões que apresentam formação de osteóide.<sup>44</sup>

Dessa forma, considerando os dados da literatura científica sobre a importância dos marcadores ósseos RANK, RANKL, OPG e OC no comportamento das lesões relacionadas ao osso e tumores maxilares, a escassez de estudos que investigaram a expressão dessas moléculas nas LROs e OS, e o comportamento clínico/biológico dessas lesões, nós hipotetizamos que nas lesões como OS, FO, LCCG a expressão de RANK/RANKL será maior do que de OPG; a DF e o COS apresentarão maior positividade de OPG do que de RANK/RANKL; sendo que a expressão de OC será mais evidente no OS e DF devido ao envolvimento osteoblástico nessas lesões.

## 2. Justificativa

O presente estudo foi realizado tomando como base:

1. A necessidade da busca de marcadores de comportamento biológico das LROs e OS, que apresentam potencial osteolítico;
2. Dados da literatura demonstrando que anormalidades no sistema RANK/RANKL/OPG desempenham um importante papel na lise óssea associada à osteoporose<sup>15,19,38</sup>, artrite<sup>13</sup>, doença periodontal<sup>12,56</sup>, tumores malignos<sup>5,8,16</sup> a tumores odontogênicos benignos como o ameloblastoma<sup>2,52,54</sup>;
3. Dados promissores demonstrando o potencial terapêutico da administração de OPG solúvel na inibição da atividade osteoclástica<sup>9,11,15,19,38,50,65</sup>;
4. Presença de dados que avaliaram somente a expressão de um ou dois dos reguladores ósseos RANK/RANKL/OPG/OC nas LROs<sup>14,20-22,33,36,42-44,51,61</sup> e OS<sup>17,18,20,30,41</sup>;
5. A escassez de dados sobre a quantificação e comparação de RANK/RANKL/OPG/OC nas LROs e OS<sup>14</sup>.

### **3. Objetivos**

*Objetivo geral:*

Analisar comparativamente a expressão das moléculas reguladoras da reabsorção óssea (RANK, RANKL e OPG) e formação óssea (osteocalcina) em lesões relacionadas ao osso e no tumor maligno ósseo dos maxilares (osteossarcoma).

*Objetivos específicos:*

1. Identificar e quantificar a imunexpressão de RANK, RANKL e OPG em amostras de lesões relacionadas ao osso tais como: fibroma ossificante, displasia fibrosa, cisto ósseo simples, lesão central de células gigantes e osteossarcoma;
2. Identificar e quantificar a imunexpressão da osteocalcina em amostras de lesões relacionadas ao osso tais como: FO, DF, COS, LCCG e OS;

## 4. Material e métodos

### ***Obtenção, Seleção e Caracterização da Amostra***

As amostras desse estudo retrospectivo foi constituído por 45 espécimes provenientes do arquivo de blocos do Laboratório de Patologia Bucal – Centro Goiano de Doenças da Boca da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (CGDB/FO/UFG): 10 de Fibroma Ossificante (FO), 10 de Displasia Fibrosa (DF), 10 de Cisto Ósseo Simples ou traumático (COS), 10 de Lesão Central de Células Gigantes (LCCG) e 5 de Osteossarcoma (OS). A seleção foi realizada a partir da investigação dos registros de laudos com diagnósticos microscópicos e posterior busca no arquivo de blocos. Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Goiás sob o protocolo nº 134/07 (Anexo 1).

Para ser incluído na amostra o espécime, contido em bloco de parafina, deveria apresentar: bom estado de conservação, com quantidade suficiente de tecido para a realização do cortes necessários; casos sem ou com evidência de sinais inflamatórios ou infecciosos leves; confirmação do diagnóstico de LRO e OS. Foram excluídos da amostra os blocos de parafina mal conservados e com quantidade de tecido insuficiente; amostras teciduais apresentando de moderado a intenso infiltrado inflamatório; e aqueles cujo diagnóstico de LRO e OS não foi confirmado.

Para a confirmação do diagnóstico microscópico e, conseqüentemente, inclusão do espécime no estudo, os blocos de parafina foram submetidos a novos recortes e corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (H&E). Todos os casos foram revisitados por um patologista com experiência (EFM) e

classificados de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), série Blue-Book 2005.<sup>3</sup> Quando necessário e possível, os exames radiográficos das amostras selecionadas foram avaliados e contribuíram para a confirmação do diagnóstico.

As características clínicas, gênero, idade e localização anatômica dos casos selecionados, foram coletadas a partir das informações clínicas registradas no formulário de encaminhamento dos espécimes para o Laboratório de Patologia do CGDB/FO/UFG.

### ***Técnicas Empregadas***

#### *Técnica de rotina (Hematoxilina e Eosina)*

O material selecionado, incluído em parafina, foi seccionado em micrótomo (Leica RM2165), obtendo-se de cada bloco cortes de 5 µm de espessura, que foram colocados sobre lâminas histológicas e corados pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE). Esses cortes foram utilizados para caracterização microscópica das amostras e confirmação do diagnóstico.

#### *Técnica da Imunoistoquímica*

Cortes seriados de 3µm foram obtidos e estendidos sobre lâminas de vidro silanizadas com 3-aminopropiltrietilsilano a 2% (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) e submetidos à técnica imunoistoquímica utilizando o método da estreptavidina-biotina-peroxidase para a identificação dos seguintes antígenos: RANK, RANKL, OPG e utilizando o método do polímero para a identificação da OC. Primeiramente, os cortes sobre as lâminas foram desparafinizados e hidratados por meio de: 1-xilol, 3 vezes, 10 minutos cada



vez; 2-álcool absoluto, 3 vezes, 2 minutos cada vez; 3-álcool etílico 95% 1 vez, 2 minutos; 4-solução salina tamponada de Tris (TBS), Ph=7,2- 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio (Merck) a 2% em metanol, por 40 minutos, para o bloqueio da peroxidase endógena. Imediatamente, foram novamente lavadas com TBS e, em seguida, as lâminas foram incubadas com uma solução de avidina a 0,1% por 10 minutos, lavadas com TBS e incubadas com solução de biotina 0,01% por 10 minutos (kit Biotin block, X0590, DAKO), a fim de se obter o bloqueio das ligações protéicas inespecíficas. Em seguida as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários, por 18 horas e mantidas na temperatura de 4°C (Tabela 2). Todas as diluições foram realizadas utilizando PBS associado a soro albumina bovina (PBS-BSA) a 1%, sendo que as diluições dos anticorpos foram determinadas em etapa de padronização. Após o período de 18 horas, foram realizadas lavagens consecutivas e, posteriormente, as lâminas foram incubadas com os anticorpos biotinilados anti-IgG de coelho/camundongo/cabra por 30 minutos, à temperatura de 22 a 25 °C, seguido pela incubação da estreptoavidina marcada com peroxidase por 30 minutos, à temperatura ambiente (kit LSAB+, Peroxidase- Universal- K0690, DAKO) para os anticorpos RANK, RANKL e OPG; para o anticorpo osteocalcina, após lavagens consecutivas, as lâminas foram incubadas com EnVision® + Dual Link System-HRP (K 4061, DAKO) durante 90 minutos. As lâminas foram novamente lavadas com TBS e, a seguir, procedemos à revelação da reação utilizando o 3.3'-Diaminobenzidina (DAB) em uma solução cromogênica (K3468, DAKO), por 2 a 3 minutos para RANK/RANKL/OPG e 0,5 a 1 minuto para OC, à temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas

contra-coradas com hematoxilina de Mayer, por 15 segundos, à temperatura ambiente. Depois de lavadas com água corrente por 10 minutos, as lâminas foram desidratadas com álcoois, passadas em xilol e montadas com solução de resina não aquosa (Entellan-Mikroskopie-Merck). Em todas as reações realizadas foram utilizadas amostras de LCCG como controles positivos para os anticorpos RANK, RANKL e OPG, e amostras de rim como controle positivo para o anticorpo osteocalcina; e amostras dos controles positivos que não foram incubadas com anticorpo primário e/ou substituído por soro de coelho/cabra como controles negativos.

Tabela 2: Anticorpos utilizados.

<b>Anticorpos</b>	<b>Descrição</b>	<b>Diluição</b>	<b>Código</b>	<b>Fabricante</b>
RANK	Policlonais de coelho anti-RANK	1:300	H-300, sc9072	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
RANKL	Policlonais de cabra anti-RANKL	1:100	N-19, sc7628	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
OPG	Policlonais de cabra anti-OPG	1:100	N-20, sc8468	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Osteocalcina	Policlonais de coelho anti-osteocalcina	1:50	FL-100, sc30044	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA

### ***Análise Quantitativa e Estatística dos Dados***

As amostras, submetidas à técnica da imunistoquímica, foram avaliadas considerando as células RANK<sup>+</sup>, RANKL<sup>+</sup>, OPG<sup>+</sup> e OC<sup>+</sup>. A avaliação quantitativa foi realizada em dois sítios diferentes: nas células fibroblásticas estromais e nas células da matriz óssea (osteoblastos/osteoclastos adjacentes ao osteóide/osso), exceto para as amostras de LCCG no qual foram consideradas as células gigantes multinucleadas. Portanto, para a análise

morfométrica, foi utilizado um microscópio óptico contendo um retículo de integração em rede quadrada (47406800000-Netzmikrometer 12,5X, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) acoplado na objetiva de 40x. A área do retículo no aumento de 40x corresponde a  $0,0961\text{mm}^2$ . Para cada amostra, foram analisados 10 campos microscópicos consecutivos, com área total de  $0,961\text{mm}^2$ .

Na avaliação das células fibroblásticas estromais foi utilizado o sistema de gradação proposto por Tobón-Arroyave et al<sup>60</sup>: 0 - sem marcação; 1 - <25% das células marcadas; 2 - 25-50% das células marcadas; 3 - >50% das células marcadas. Entretanto, na matriz óssea, a análise foi realizada considerando as células positivas, possibilitando, assim, a avaliação da densidade (por  $\text{mm}^2$ ) dos osteoclastos positivos para a proteína RANK; para as proteínas RANKL, OPG e OC a análise foi realizada considerando os osteoblastos positivos e negativos, avaliando, portanto, a porcentagem média de células positivas/total de células.

A análise quantitativa diferenciada para os anticorpos avaliados foi realizada tomando como base a marcação desses anticorpos. O RANK é expresso principalmente em precursores de osteoclastos e osteoclastos.<sup>6,32,34,55</sup> Por outro lado, os anticorpos RANKL, OPG e OC são expressos principalmente em células estromais e osteoblastos.<sup>6,10,19,29,32,58,59,66</sup>

Os resultados da análise quantitativa das células RANK<sup>+</sup>, RANKL<sup>+</sup>, OPG<sup>+</sup> e OC<sup>+</sup> foram submetidos à análise comparativa nos diferentes grupos de lesões (FO, DF, COS, LCCG e OS), utilizando os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e de Friedman. Valor de P (Probabilidade) menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## 5. Publicação

Título da publicação:

**MARKERS OF BONE REMODELING IN NEOPLASTIC AND BONE-RELATED LESIONS**

Publicação na revista Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology em 2010, edição 110, páginas:624-631 (Anexo 2)

## **6. Conclusões/Considerações finais**

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que uma expressão mais elevada de RANKL do que OPG no fibroma ossificante, na lesão central de células gigantes e no osteossarcoma, ao contrário do que ocorre na displasia fibrosa e cisto ósseo simples, favorece a reabsorção óssea e pode estar relacionada com as características clínicas dessas lesões, que apresentam comportamento agressivo e osteolítico. Por outro lado, a alta expressão de osteocalcina na displasia fibrosa e osteossarcoma está relacionada com o envolvimento osteoblástico nessas lesões.

Os resultados encontrados nesse estudo podem, portanto, contribuir para o conhecimento da patogênese e estabelecimento do diagnóstico dessas lesões e para o desenvolvimento de drogas específicas capazes de modular a reabsorção induzida pelo sistema RANK-RANKL-OPG e minimizar a extensão óssea promovida por algumas dessas lesões.

## 7. Referências bibliográficas<sup>1</sup>

1. Alsharif MJ, Sun ZJ, Chen XM, Wang SP, Zhao YF. Benign Fibro-Osseous Lesions of the Jaws: A Study of 127 Chinese Patients and Review of the Literature. *Int J Surg Pathol* 2009;17:122-34.
2. Andrade FR, Sousa DP, Mendonça EF, Silva TA, Lara VS, Batista AC. Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:548-55.
3. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon, France, IARC Press, p.284-327, 2005.
4. Bar-Shavit Z. The Osteoclast: A Multinucleated, Hematopoietic-Origin, Bone-Resorbing Osteoimmune Cell. *Journal of Cellular Biochemistry* 2007;102:1130–39.
5. Blair JM, Zheng Y, Dunstan CR. RANK ligand. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007;39:1077–1081.
6. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research & Therapy* 2007; 9:S1.
7. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337-42.
8. Chen G, Sircar K, Aprikian A, Potti A, Goltzman D, Rabbani SA. Expression of RANKL/RANK/OPG in Primary and Metastatic Human Prostate Cancer as Markers of Disease Stage and Functional Regulation. *Cancer* 2006;107(2):289-98.

1- As referências apresentadas nesse capítulo se referem àquelas citadas na Caracterização do problema, Justificativa e Material e métodos, e não às apresentadas no artigo científico. Referências seguindo as normas da Faculdade de Odontologia da UFG(Lélia Wanderley de Campos-Guia para apresentação de trabalhos monográficos da Faculdade de Odontologia da UFG, Goiânia, 2005).

9. Clohisy DR, Mantyh PW. Bone cancer pain and the role of RANKL/OPG. *J Musculoskel Neuron Interact* 2004;4(3):293-300.
10. Cohen Jr MM. The New Bone Biology: Pathologic, Molecular, and Clinical Correlates. *American Journal of Medical Genetics* 2006;140A:2646–2706.
11. Fili S, Karalaki M, Schaller B. Therapeutic implications of osteoprotegerin. *Cancer Cell International* 2009;9:26.
12. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Ávila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiology Immunology* 2006;21:12–20.
13. Geusens PP, Landewé RBM, Garnero P, Chen D, Dunstan CR, Lems WF, et al. The Ratio of Circulating Osteoprotegerin to RANKL in Early Rheumatoid Arthritis Predicts Later Joint Destruction. *Arthritis & Rheumatism* 2006;54:1772-7.
14. Good CR, O’Keefe RJ, Puzas JE, Schwars EM, Rosier RN. Immunohistochemical study of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand. *J Surg Oncol* 2002;79:174-79.
15. Hamdy NA. Osteoprotegerin as a potential therapy for osteoporosis. *Curr Rheumatol Rep* 2006;8(1):50-4.
16. Heider U, Hofbauer LC, Zavrski I, Kaiser M, Jakob C, Sezer O. Novel aspects of osteoclast activation and osteoblast inhibition in myeloma bone disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005;338:687–93.
17. Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S.

- Osteoprotegerin Production by Human Osteoblast Lineage Cells Is Stimulated by Vitamin D, Bone Morphogenetic Protein-2, and Cytokines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998;250:776-81.
18. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, et al. Stimulation of Osteoprotegerin Ligand and Inhibition of Osteoprotegerin Production by Glucocorticoids in Human Osteoblastic Lineage Cells: Potential Paracrine Mechanisms of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *Endocrinology* 1999;140:4382-89.
  19. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001;79:243–53.
  20. Hopyan S, Gokgoz N, Bell RS, Andrulis IL, Alman BA, Wunder JS. Expression of Osteocalcin and its Transcriptional Regulators Core-Binding Factor Alpha I and MSX2 in Osteoid-forming Tumours. *J Orthopaedic Research* 1999;17:633-38.
  21. Huang L, Teng XY, Cheng YY, Lee KM, Kumta SM. Expression of preosteoblast markers and Cbfa-1 and Osterix gene transcripts in stromal tumour cells of giant cell tumour of bone. *Bone* 2004;34:393-401.
  22. Itonaga I, Hussein I, Kudo O, Sabokbar A, Watt-Smith S, Ferguson D, et al. Cellular mechanisms of osteoclast formation and lacunar resorption in giant cell granuloma of the jaw. *J Oral Pathol Med* 2003;32:224-31.
  23. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyacı AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol* 2009;132:533–46.



24. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease. *Endocrine Reviews* 2008;29(2):155–192.
25. Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology* 2001;142:5050–55.
26. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397:315-23.
27. Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. Histological Typing of Odontogenic Tumours. WHO International Classification of Tumours. 2 ed. Berlin, Germany, Springer-Verlag, 1992.
28. Kumamoto H, Ooya K. Expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP), osteoclast differentiation factor (ODF)/receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF)/osteoprotegerin (OPG) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2004;33:46-52.
29. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell* 1998;93: 165-76.
30. Lamoureux F, Richard P, Wittrant Y, Battaglia S, Pilet P, Trichet V, et al. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res* 2007;67:7308-18.
31. Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: Regulators of Immune Responses and Bone Physiology. *Annals of the New York Academy of*

Sciences 2008;1143:123-150.

32. Lerner UH. Factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:64-81.
33. Liu B, Yu SF, Li TJ. Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts. *J Oral Pathol Med* 2003;32:367–75.
34. Lossdorfer S, Gotz W, Jager A. Immunohistochemical localization of Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. *Calcified Tissue International* 2002; 71:45-52.
35. Makek M. Clinical pathology of fibro-osteo-cemental lesions in the cranio-facial and jaw bones: a new approach to differential diagnosis. New York, Karger, p.1-97,1983.
36. Marie PJ, Pollak C, Chanson P, Lomri A. Increased Proliferation of Osteoblastic Cells Expressing the Activating  $G_s\alpha$  Mutation in Monostotic and Polyostotic Fibrous Dysplasia. *American Journal of Pathology* 1997; 150:1059-69.
37. Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *TRENDS in Molecular Medicine* 2005;11(2):76-81.
38. McClung MR. Inhibition of RANKL as a treatment for osteoporosis: preclinical and early clinical studies. *Curr Osteoporos Rep* 2006;4(1):28-33.
39. Menezes R, Bramante CM, Paiva KBS, Letra A, Carneiro E, Zambuzzi WF. Receptor activator  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -ligand and osteoprotegerin protein

expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:404-9.

40. Mori K, Ando K, Heymann D, Rédini F. Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) stimulates bone-associated tumors through functional RANK expressed on bone-associated cancer cells? *Histol Histopathol* 2009;24:235-242.
41. Mori K, Le Goff B, Berreur M, Riet A, Moreau A, Blanchard F, et al. Human osteosarcoma cells express functional receptor activator of nuclear factor-kappa B. *J Pathol* 2007;211:555–56.
42. Murata A, Fujita T, Kawahara N, Tsuchiya H, Tomita K. Osteoblast lineage properties in giant cell tumors of bone. *J Orthop Sci* 2005;10:581-88.
43. Ono A, Tsukamoto G, Nagatsuka H, Yoshihama Y, Rivera RS, Katsurano M, et al. An immunohistochemical evaluation of BMP-2, -4, osteopontin, osteocalcin and PCNA between ossifying fibromas of the jaws and peripheral cemento-ossifying fibromas on the gingiva. *Oral Oncology* 2007;43:339-44.
44. Park YK, Yang MH, Kim YW, Park HR. Osteocalcin expression in primary bone tumors-In Situ Hybridization and immunohistochemical study. *Journal of Korean Medical Science* 1995;10:263-68.
45. Pimenta FJ, Silveira LFG, Tavares GC, Silva AC, Perdigão PF, Castro WH, et al. HRPT2 gene alterations in ossifying fibroma of the jaws. *Oral Oncology* 2006;42:735-39.
46. Pindborg JJ, Kramer IRH, Torloni H. *Histological Typing of Odontogenic Tumours, Jaws Cysts and Allied Lesions*. Geneva, Switzerland, World Health Organization, 1971.

47. Rani S, MacDougall M. Dental Cells Express Factors That Regulate Bone Resorption. *Molecular Cell Biology Research Communications* 2000; 3:145–52.
48. Regezi JA. Odontogenic cysts, odontogenic tumors, fibroosseous, and giant cell lesions of the jaws. *Mod Pathol* 2002;15:331-41.
49. Reid P, Holen I. Pathophysiological roles of osteoprotegerin. *European Journal of Cell Biology* 2009;88:1-17.
50. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 2000;298:1508-14.
51. Sakamoto A, Oda Y, Iwamoto Y, Tsuneyosh M. A Comparative Study of Fibrous Dysplasia and Osteofibrous Dysplasia With Regard to Expressions of *c-fos* and *c-jun* Products and Bone Matrix Proteins: A Clinicopathologic Review and Immunohistochemical Study of *c-fos*, *c-jun*, Type I Collagen, Osteonectin, Osteopontin, and Osteocalcin. *Human Pathology* 1999;30:1418-26.
52. Sandra F, Hendarmin L, Kukita T, Nakao Y, Nakamura N, Nakamura S. Ameloblastoma induces osteoclastogenesis: a possible role of ameloblastoma in expanding in the bone. *Oral Oncol* 2005;41:637-44.
53. Schneeweis LA, Willard D, Milla ME. Functional Dissection of Osteoprotegerin and Its Interaction with Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand. *Journal Of Biological Chemistry* 2005;280:41155-64.
54. Silva TA, Batista AC, Mendonça EF, Leles CR, Fukada S, Cunha FQ. Comparative expression of RANK, RANKL, and OPG in keratocystic odontogenic tumors, ameloblastomas, and dentigerous cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:333-41.

55. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2004;15:49–60.
56. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol* 2005;76:2033-41.
57. Tay JY, Bay BH, Yeo JF, Harris M, Meghji S, Dheen ST. Identification of RANKL in osteolytic lesions of the facial skeleton. *J Den Res* 2004; 83:349-53.
58. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic Regulation Of Osteoclast Development And Function. *Nature* 2003;4:638-49.
59. Teitelbaum SL. Osteoclasts: What Do They Do and How Do They Do It? *The American Journal of Pathology* 2007; 170(2):427-435.
60. Tobón-Arroyave SI, Franco-González LM, Isaza-Guzmán DM, Floréz-Moreno GA, Bravo-Vásquez T, Castañeda-Peláez DA, et al. Immunohistochemical expression of RANK, GRalpha and CTR in central giant cell granuloma of the jaws. *Oral Oncol* 2005;41:480-8.
61. Toyosawa S, Yuki M, Kishino M, Ogawa Y, Ueda T, Murakami S, et al. Ossifying fibroma vs fibrous dysplasia of the jaw: molecular and immunological characterization. *Modern Pathology* 2007;20:389-96.
62. Vernal R, Dezerega A, Dutzan N, Chaparro A, León R, Chandía S. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral Diseases* 2006;12:283-89.
63. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Tends Mol Med* 2006;12:17-25.
64. Wittrant Y, Théoleyre S, Chipoy C, Padrines M, Blanchard F, Heymann D,

et al. RANK/RANKL/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1704:49-57.

65. Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2009;2:56–64.

66. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki SI, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCEyRANKL. *Cell Biology* 1998;95:3597–3602.

## **8. Anexos**

**Anexo 1:** Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Goiás (CEP/UFG)

**Anexo 2:** Publicação do artigo MARKERS OF BONE REMODELING IN PLASTIC AND BONE-RELATED LESIONS na revista Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology em 2010, edição 110, páginas: 624-631

# Anexo 1



Nº: 134/2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CEP - UFG



## PARECER CONSUBSTANCIADO

### I – Identificação

- Título do projeto: **“Expressão de reguladores da reabsorção óssea (RANK/RANKL/OPG) em lesões fibro-ósseas e outras lesões relacionadas ao osso”**
- Pesquisador responsável: **Aline Carvalho Batista**
- Pesquisadores participantes: **Elismauro Francisco de Mendonça, Marco Aurélio de Carvalho, Rafael Ferreira da Costa.**
- Instituição onde se realizará: **Universidade Federal de Goiás – FO**
- Data de apresentação ao CEP: **18/12/2007**

### II – Objetivos

O projeto tem por **objetivo** identificar, quantificar e avaliar comparativamente a expressão das moléculas reguladoras da reabsorção óssea RANK, RANKL e OPG no tumor maligno ósseo dos maxilares (osteossarcoma) e lesões fibro-ósseas tais como: displasia fibrosa, lesão central de células gigantes, cisto ósseoaneurismático e fibroma ossificante.

### III – Sumário do projeto

O supracitado projeto é decorrente de projeto de final de curso em Odontologia, junto à Faculdade de Odontologia da UFG.

Estarão sob investigados 50 amostras de material histopatológico armazenados no Laboratório de Patologia Bucal do Departamento de Ciências Estomatológicas da FO/UFG, proveniente de casos de pacientes atendidos no Centro Goiano de Doenças da Boca, de ambos os gêneros, além de consulta aos prontuários e avaliação de exames radiológicos, visando atingir o objetivo supracitado.

*Delineamento experimental:* 1. Selecionar amostras de displasia fibrosa, lesão central de células gigantes, cisto ósseo aneurismático, fibroma ossificante, e osteossarcoma; 2. Investigar a história clínica e avaliar microscopicamente todas as lâminas dos casos selecionados; 3. Padronização das reações de imunoistoquímica utilizando os marcadores para RANK, RANKL e OPG; 4. Identificação das moléculas RANK, RANKL e OPG, por meio da técnica de imunoistoquímica, em todos os casos selecionados; 5. Quantificação do número de células imunomarcadas e análise dos dados referentes aos reguladores da reabsorção óssea RANK, RANKL e OPG; 6. Padronização das reações de RT-PCR; 7. Identificação e quantificação da expressão do RNAm dos fatores RANK, RANKL e OPG em tumor maligno ósseo dos maxilares





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**CEP - UFG**



(osteossarcoma) e lesões fibro- ósseas tais como: displasia fibrosa, lesão central de células gigantes, cisto ósseo aneurismático e fibroma ossificante.

**IV – Comentários do relator, frente à Resolução CNS 196/96 e complementares em particular sobre:**

O protocolo está bem organizado, claro, conciso, coerente. Não há risco direto aos pacientes, já que serão utilizados materiais e informações de arquivo e baixíssima possibilidade de constranger os voluntários.

Não há benefício direto aos pacientes. Dentre os benefícios à comunidade, após o término do trabalho, está em geração de conhecimento acerca da etiologia de pelo menos 5 tipos de câncer ósseo bucal, o que facilitará diagnósticos clínicos e laboratoriais.

Houve impecável preocupação em solicitar autorização prévia da Coordenação do Centro Goiano de Doenças da Boca e da Administração da Faculdade de Odontologia.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está claro quanto à autorização do paciente para a utilização do material histopatológico e das informações em prontuário e exames laboratoriais, adequado às normas do CEP/UFG.

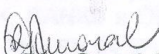
Entretanto, no Termo de Consentimento aparecem os três pesquisadores envolvidos e telefones apenas de dois deles.

**V – Parecer do COEP**

O parecer é pela aprovação do presente projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG.

**VI – Data da reunião**

Goiânia, 11 de fevereiro 2008

  
**Profa. Dra. Rita Goreti Amaral**  
Coordenadora CEP-UFG

## **Anexo 2**