

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

SÉRGIO ALVES DE OLIVEIRA FILHO

**ANGIOGÊNESE (WT1, CD31 E CD105) E MUTAÇÃO (GENE H3F3A) EM LESÕES
CENTRAIS DE CÉLULAS GIGANTES AGRESSIVAS E NÃO AGRESSIVAS.**

Goiânia
2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

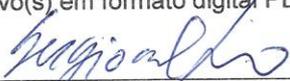
Nome completo do autor: Sérgio Alves de Oliveira Filho

Título do trabalho: Angiogênese (WT1, CD31 e CD105) e mutação (Gene H3F3A) em lesões centrais de células gigantes agressivas e não agressivas

3. Informações de acesso ao documento:

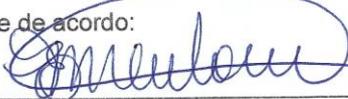
Concorda com a liberação total do documento **SIM** **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital/PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 15 / 10 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

SÉRGIO ALVES DE OLIVEIRA FILHO

**ANGIOGÊNESE (WT1, CD31 E CD105) E MUTAÇÃO (GENE H3F3A) EM LESÕES
CENTRAIS DE CÉLULAS GIGANTES AGRESSIVAS E NÃO AGRESSIVAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Clínica Odontológica.

Linha de pesquisa: Alterações no sistema Estomatognático

Orientador: Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça

Goiânia

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Oliveira Filho, Sérgio Alves de
Angiogênese (WT1, CD31 e CD105) e mutação (Gene H3F3A) em lesões centrais de células gigantes agressivas e não agressivas [manuscrito] / Sérgio Alves de Oliveira Filho. - 2019.
86 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Odontologia (FO), Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Goiânia, 2019.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Granuloma de células gigantes. 2. Tumor de células gigantes do osso. 3. Proteínas WT1. 4. Endoglin. 5. Histonas. I. Mendonça, Prof. Dr. Elismauro Francisco de, orient. II. Título.

CDU 616.314



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 210 da sessão de Defesa de Dissertação de **Sérgio Alves de Oliveira Filho**, que confere o título de Mestre em **Odontologia**, na área de concentração em **Clínica Odontológica**.

Aos **vinte e seis dias do mês de agosto de 2019**, às **14:30**, no **auditório da Faculdade de Odontologia**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada **“Angiogênese (WT1, CD31 e CD105) e mutação (Gene H3F3A) em lesões centrais de células gigantes agressivas e não agressivas”**. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor **Elismauro Francisco de Mendonça (PPGO/UFMG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor **César Augusto Sam Tiago Vilanova Costa (AACG)**, Professora Doutora **Fernanda Paula Yamamoto Silva (PPGO/UFMG)**, membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor **Elismauro Francisco de Mendonça**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **vinte e seis dias do mês de agosto de 2019**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Paula Yamamoto Silva, Professora do Magistério Superior**, em 26/08/2019, às 16:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elismauro Francisco De Mendonça, Professor do Magistério Superior**, em 26/08/2019, às 16:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova Costa, Usuário Externo**, em 26/08/2019, às 16:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nádia Do Lago Costa, Coordenadora de Pós-Graduação**, em 26/08/2019, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cláudio Rodrigues Leles, Vice-Coordenador de Pós-graduação**, em 27/08/2019, às 10:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Luciane Ribeiro De Rezende Sucasas Da Costa, Professor**

29/08/2019

SEI/UFG - 0821421 - Ata de Defesa de Dissertação



do **Magistério Superior**, em 29/08/2019, às 18:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0821421** e o código CRC **AEA165F7**.

Referência: Processo nº 23070.027140/2019-15

SEI nº 0821421

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

BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE MESTRADO

Discente: Sérgio Alves de Oliveira Filho

Orientador: Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça

MEMBROS:

Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça - UFG

Prof. Dr. Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova Costa - AACG

Prof^a. Dr^a. Fernanda Paula Yamamoto Silva - UFG

Suplentes:

Prof^a. Dr^a. Geisa Badauy Lauria Silva - UNIP

Prof. Dr. Luciano Alberto de Castro - UFG

**À Maria Fernanda e Renata, razões do meu acordar,
das minhas batalhas diárias e do meu equilíbrio.**

**À Sérgio e Jailma, que me conduziram com firmeza no
caminho da educação, da persistência e do esforço.**

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pois sem Ele eu nada seria. Tudo que sou devo a Ele. Nos momentos de fraqueza, de pessimismo, de incertezas, de cansaço, Ele me pegou pela mão, me levantou e me guiou sempre pelo melhor caminho, mesmo quando eu achava que aquele não era o melhor pra mim.

A **Maria Fernanda Estrêla Alves**, por transformar minha vida diariamente e me encher de tanto amor, mesmo após minhas sucessivas e longas ausências. Sua alegria me contagia e me faz querer ser o melhor de mim todos os dias.

A **Renata Pereira Estrêla Alves**, pelo amor, companheirismo, pelas consultorias científicas informais a mim dadas durante a produção deste trabalho, pelos puxões de orelha por vezes necessários, por sua dedicação à nossa família. Obrigado por ser meu porto seguro e por me mostrar que nele sempre poderei atracar em paz.

A **Sérgio Alves de Oliveira e Jailma Araújo Alves de Oliveira**, pelo amor e carinho que sempre tiveram comigo, pela educação rígida e exemplar que me proporcionaram ser o homem e o profissional que sou hoje. Minha eterna gratidão a vocês.

A **Filipe Araújo Alves de Oliveira**, pela amizade e por acalmar meu coração nos momentos mais improváveis com sua paciência e serenidade. Tenho orgulho de ser seu irmão.

Ao meu orientador e amigo, **Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça**, pela paciência, compreensão e por todo suporte a mim oferecido durante a produção deste trabalho. Tive a oportunidade de ver seu cuidado para com seus orientandos e assim quero ser com os que forem orientados por mim.

Ao amigo, **Prof. Ms. Allisson Filipe Lopes Martins**, pela grande ajuda na condução deste trabalho, pela paciência em ensinar metodologias complexas a uma pessoa inicialmente imatura, do ponto de vista acadêmico. Obrigado pela parceria de todas as horas e que ela possa durar por muitos anos.

Aos amigos do **Centro Goiano de Doenças da Boca (CGDB)**, **Wilson Mariano, Carlos Henrique, Sebastião Silvério, Cláudia Duarte e todos os professores do corpo clínico** pela amizade, convivência e aprendizado durante a pós-graduação.

À **Profª Drª Marília Oliveira Morais** e **Profª Drª Angélica Ferreira Oton Leite**, pela seriedade na avaliação deste trabalho e pelo engrandecimento que proporcionaram com suas considerações. Aprendi muito com vocês e ainda pretendo aprender muito mais.

Ao **programa de pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás**, por me permitir conhecer o mundo acadêmico de forma mais profunda e me proporcionar um grande amadurecimento pessoal e profissional.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG)**, por me contemplar com a bolsa de Mestrado.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 Características clínicas e radiográficas das LCCG agressivas e não agressivas de acordo com Chuong <i>et al.</i> (1986)	23
Figura 1 Esquema da patogênese da LCCG	25
Figura 2 Desenho esquemático da localização da histona H3 no nucleossomo e na cromatina	33
Quadro 2 Características dos anticorpos utilizados para o estudo	40
Quadro 3 Quantificação do WT1	41
Figura 3 Expressão do anticorpo WT1	45
Figura 4 Expressão do anticorpo CD31	46
Figura 5 Expressão do anticorpo CD105	47
Figura 6 Expressão do anticorpo histona H3.3 G34W	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Dados clínico-radiográficos das LCCG	44
Tabela 2 Expressão de WT1 em células mononucleares (CMN) e células gigantes multinucleadas (CGM) representados em mediana (Q25-Q75)	46
Tabela 3 Densidade microvascular (DMV) de CD31 e CD105 fornecidos em mediana (Q25-Q75)	48

LISTA DE SIGLAS

bFGF	Fator de crescimento de fibroblasto básico
CD31	<i>Cluster</i> de Diferenciação 31
CD105	<i>Cluster</i> de Diferenciação 105
CGCL	<i>Central Giant Cell Lesion</i> (Lesão Central de células Gigantes)
CGM	Células gigantes multinucleadas
CMN	Células mononucleares
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DIC	Escore de distribuição de intensidade de coloração
DMV	Densidade microvascular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FASN	Ácido graxo sintase
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
FO/UFG	Faculdade de Odontologia/Universidade Federal de Goiás
FSC-GM	Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos-Macrófagos
FSC-M	Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos
GCT	<i>Giant Cell Tumour</i> (Tumor de células gigantes)
HE	Hematoxilina e eosina
IL	Interleucina
LCCG	Lesão Central de Células Gigantes
MVD	<i>Microvascular Density</i> (Densidade microvascular)
PBS	Solução salina tamponada por fosfato
PECAM-1	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa β
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa β
TBS	Solução TRIS salina
TCG	Tumor de Células Gigantes
TGF	Fator de Crescimento Transformador
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
TRIS	Tris (Hidroximetil) Aminometano
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
WT1	Tumor de Wilms 1

RESUMO

A lesão central de células gigantes (LCCG) é uma lesão osteolítica benigna que acomete os ossos gnáticos, apresenta etiologia controversa e possui comportamento biológico variável, podendo ser classificada em agressiva e não agressiva. Apesar de ser bastante vascularizada, não existe consenso se é uma lesão de origem vascular neoplásica ou proliferativa reacional, e entidade distinta do tumor de células gigantes (TCG). Acredita-se que os TCG compartilhem de características histológicas e possuam comportamento biológico semelhante ao da LCCG agressiva, entretanto, o TCG apresenta uma mutação gênica localizada no gene H3F3A códon G34W da proteína histona H3.3, ainda pouco explorada nas LCCG. O propósito deste estudo foi avaliar comparativamente 38 espécimes de LCCG agressivas (n=9) e não agressivas (n=29) utilizando os marcadores WT1, CD31 e CD105 (angiogênicos) e histona H3.3 G34W (mutacional), por meio da técnica de imunohistoquímica. O WT1 foi expresso positivamente em todos os espécimes, tanto nas células mononucleares como nas células gigantes, com maior expressão em células mononucleares de lesões agressivas. O CD31 e o CD105 foram expressos nos microvasos, e a densidade microvascular (DMV) de ambos foi maior nas lesões agressivas. A DMV do CD105 foi superior a encontrada pelo CD31, indicando um grau de neoangiogênese superior para ambos os grupos quando comparados com a vascularização pré-existente identificada pela expressão de CD31. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão dos marcadores angiogênicos e o comportamento biológico das LCCG. Não houve expressão de mutação gênica da histona H3.3, tanto nas lesões agressivas quanto nas não agressivas. Em síntese, os resultados indicam que as LCCG são lesões de natureza vascular neoplásicas proliferativas, apresentam um perfil angiogênico proliferativo nas lesões agressivas e não agressivas e que, independente do seu comportamento biológico, não expressam mutação da histona H3.3, o que caracteriza sua distinção dos TCG.

Palavras-Chaves: Granuloma de Células Gigantes; Proteínas WT1; Molécula-1 de adesão celular endotelial de plaquetas; Endogлина; Histonas; Tumor de células gigantes do osso.

ABSTRACT

A central giant cell lesion (CGCL) is a benign osteolytic lesion that affects gnathic bones and has a controversial etiology, a variable biological behavior, and can be classified as aggressive or nonaggressive. Although it is highly vascularized, there is no consensus about its neoplastic or proliferative vascular origin or whether it is a distinct lesion from a giant cell tumor (GCT). It is speculated that a GCT shares histological features and has a biological behavior similar to aggressive CGCLs. A genetic mutation located in the H3F3A gene codon G34W of the histone H3.3 protein has been found in GCTs; however, little is known about this mutation in CGCLs. The purpose of this study was to evaluate aggressive (n = 9) and nonaggressive (n = 29) CGCL specimens using WT1, CD31 and CD105 (angiogenic) and histone H3.3 G34W (mutational) markers using an immunohistochemistry technique. WT1 was positively expressed in all specimens, both in mononuclear and giant cells, with higher expression in aggressive CGCL mononuclear cells. CD31 and CD105 were expressed on microvessels, and their microvascular density (MVD) was higher in aggressive lesions. The CD105 MVD was higher than the CD31 MVD, indicating a higher degree of neoangiogenesis in both groups compared to the preexisting vascularization. There was no statistically significant difference between angiogenic marker expressions between groups. There was no expression of histone H3.3 gene mutation in aggressive or nonaggressive lesions. In summary, the results indicate that CGCLs are proliferative neoplastic vascular lesions that present a high proliferative angiogenic profile in aggressive and nonaggressive lesions and, despite their biological behavior, do not express histone H3.3 mutation, which characterizes the distinction of GCTs.

Key Words: Giant Cell Granuloma; WT1 Proteins; Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1; Endoglin; Histones; Giant Cell Tumor of Bone.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 LESÃO CENTRAL DE CÉLULAS GIGANTES	22
2.2 TUMOR DE CÉLULAS GIGANTES X LCCG	27
2.3 MARCADORES ANGIOGÊNICOS E MUTACIONAL	29
2.3.1 WT1	29
2.3.2 CD31	30
2.3.3 CD105	31
2.3.4 Histona H3.3	32
3 JUSTIFICATIVA	36
4 OBJETIVOS	37
4.1 OBJETIVO GERAL	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
5 MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA	38
5.2 TÉCNICA DA HEMATOXILINA E EOSINA	39
5.3 TÉCNICA DA IMUNOISTOQUÍMICA	39
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	42
6 RESULTADOS	43
6.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS ESPÉCIMES	43
6.2 ANÁLISE DOS ANTICORPOS ANGIOGÊNICOS	45
6.2.1 Análise do anticorpo WT1	45
6.2.2 Análise do anticorpo CD31	46
6.2.3 Análise do anticorpo CD105	47
6.3 ANÁLISE DO ANTICORPO HISTONA H3.3 G34W	48
7 DISCUSSÃO	49
8 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO	63

1 INTRODUÇÃO

A lesão central de células gigantes (LCCG) é uma das patologias dos ossos gnáticos que mais gera discussão no meio acadêmico. Sua patogênese e tratamento ideal ainda geram controvérsias, principalmente quando são de comportamento biológico agressivo (KABAN *et al.*, 2002; REGEZI, 2004; DE LANGE *et al.*, 2007; VALENTINE & NELSON, 2011; PEACOCK, 2017).

A LCCG nos ossos gnáticos é uma lesão osteolítica rara, responsável por cerca de 7% de todos os tumores ósseos dos maxilares. (SUN *et al.*, 2009; TRIANTAFILLIDOU *et al.*, 2011). Pode acometer maxila ou mandíbula, com uma incidência na mandíbula duas vezes maior que nas maxilas (TRIANAFILLIDOU *et al.*, 2011; JERKINS *et al.*, 2016). Ocorre com maior frequência nas primeiras três décadas de vida, com pico de incidência entre 10 e 19 anos, e acomete o gênero feminino com maior frequência (ROBERSON *et al.*, 1997; SUN *et al.*, 2009; TRIANTAFILLIDOU *et al.*, 2011, JERKINS *et al.*, 2016). Com referência ao aspecto radiográfico, variam de pequenas lesões uniloculares até grandes lesões multiloculares, com deslocamento de dentes e germes dentários, reabsorções radiculares, além de expansão e/ou perfuração de cortical (ROBERSON *et al.*, 1997; DE LANGE *et al.*, 2007; TRIANTAFILLIDOU *et al.*, 2011; JERKINS *et al.*, 2016).

O comportamento biológico da LCCG pode ser estabelecido por meio de exames clínico e de imagem, e classificado de acordo com Chuong *et al.* (1986), em lesões agressivas e não agressivas. As LCCG não agressivas são assintomáticas ou minimamente sintomáticas, possuem crescimento lento, ausência de reabsorções radiculares ou fenestrações corticais e baixa taxa de recidiva. Já as lesões agressivas são sintomáticas, apresentam reabsorções radiculares, perfuração da cortical e alta taxa de recidiva (KABAN *et al.*, 2002; PEACOCK, 2017; HOSUR *et al.*, 2018; ETOZ *et al.*, 2019).

A diferenciação entre os dois tipos de LCCG, agressivas e não agressivas, é essencial para a definição do tratamento e, atualmente, as características clínicas e imaginológicas são as únicas formas de distinguí-las. Ainda não existem marcadores biológicos confiáveis que possibilitem uma definição precisa da agressividade das lesões (DE LANGE *et al.*, 2007; VALENTINE & NELSON, 2011; MARTINS *et al.*, 2015; PEACOCK, 2017).

O tratamento cirúrgico das lesões agressivas e extensas, de acordo com o grau de comprometimento dos ossos gnáticos, pode ser desfigurante e as cirurgias reconstrutivas adicionais são necessárias para uma posterior reabilitação funcional e estética (KABAN *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2015). Diante disto, e por serem lesões não metastizáveis, as terapias menos invasivas nessas lesões têm se tornado uma opção para reduzir o grau de morbidade cirúrgica (DE LANGE *et al.*, 2007; KABAN *et al.*, 2007; O'CONNELL *et al.*, 2015).

Dois estudos retrospectivos de séries de casos com o uso de terapia antiangiogênica, utilizando interferon- α , levantaram a hipótese de que as LCCG são lesões vasculares proliferativas, ou dependentes do processo de angiogênese, e por esta razão responderiam a terapia antiangiogênica. Kaban *et al.* (2002), observaram que de uma série de 8 casos de LCCG agressivas tratadas com enucleação e administração de interferon- α durante o período pós-operatório de 2 anos, 7 indivíduos obtiveram a remissão completa das lesões e não apresentaram recidivas durante o acompanhamento. Kaban *et al.* (2007), observaram que de 26 pacientes submetidos ao mesmo protocolo, 16 completaram a terapia e foram considerados livres de lesão após 2 anos de acompanhamento. Seis se encontravam em fase de remissão, mas não tinham acompanhamento suficiente para serem considerados livres de recidiva. Os outros 4 indivíduos continuavam sob terapia e sem o resultado final. Schreuder *et al.*, (2017), trataram 45 indivíduos com LCCG utilizando o mesmo protocolo e observaram que em apenas 6 pacientes houve progressão e recidiva da LCCG.

A angiogênese possui um papel importante no crescimento e desenvolvimento dos tecidos normais, bem como em uma variedade de processos patológicos, como o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, câncer de mama, o líquen plano e o ameloblastoma (GADBAIL *et al.*, 2011; MARIONI *et al.*, 2010; NAIR *et al.*, 2016). Os tecidos neoplásicos necessitam de oxigênio e nutrientes para se desenvolverem e, para isso, induzem a formação de novos vasos sanguíneos por meio da angiogênese (GADBAIL *et al.*, 2011), a qual se inicia a partir da rede vascular pré-existente por meio da remodelação da matriz extracelular, migração e proliferação endotelial, diferenciação capilar e anastomoses (KUMAR *et al.*, 2016; NAIR *et al.*, 2016).

Vários estudos têm analisado a expressão de marcadores angiogênicos nas LCCG (VERED *et al.*, 2006; FALCI *et al.*, 2014; EL-ATTAR E WAHBA, 2016;

RAZAVI E YAHYAABADI, 2018), no entanto, existem poucas evidências sobre a correlação desses marcadores com a agressividade destas lesões. O marcador tumor de Wilms 1 (WT1), o CD31 e o CD105 são alguns destes marcadores.

O WT1 foi inicialmente identificado como um gene supressor tumoral no desenvolvimento do tumor de Wilms e, atualmente, a expressão da proteína tem sido identificada em um grande número de lesões vasculares malignas e tumores sólidos de localizações diversas, como no estômago, próstata, sistema biliar e urinário, rabdomyosarcoma, câncer de mama, câncer de cólon, osteossarcoma e melanoma (AL DHAYBI *et al.*, 2010; NETTO *et al.*, 2012). A investigação da expressão do WT1 pode guiar o tratamento a ser instituído em lesões vasculares de difícil diagnóstico, já que resultados positivos podem sugerir a presença de uma lesão vascular proliferativa neoplásica e os negativos apontam para uma malformação vascular (AL DHAYBI *et al.*, 2010; NETTO *et al.*, 2012).

O WT1 tem envolvimento ativo na proliferação de células endoteliais e na formação de vasos. Segundo Timár *et al.* (2005), a expressão da proteína WT1 é mantida durante a angiogênese, e pode reaparecer durante uma neoangiogênese reparadora ou em tumores endoteliais, o que faz do WT1 um marcador endotelial importante na caracterização da vascularização da lesão. O WT1 regula diretamente a transcrição e a expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), a principal citocina reguladora de crescimento vascular. Dessa forma, tumores com alta expressão de WT1 produzem mais VEGF, gerando mais angiogênese e crescimento tumoral (MCCARTY *et al.*, 2011; KATURI *et al.*, 2014).

O CD31, também conhecido como molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1), é uma glicoproteína transmembrana de 130-kDa, presente na superfície de plaquetas, monócitos, macrófagos e neutrófilos. É um constituinte da junção intercelular endotelial durante a angiogênese e um dos marcadores imunoistoquímicos mais utilizados para células endoteliais e lesões vasculares benignas ou malignas. Dessa forma, por meio da expressão do CD31 podemos quantificar a vascularização presente nas LCCG (DE YOUNG, *et al.*, 1998; PEACOCK, *et al.*, 2012; KOUHSOLTANI *et al.*, 2016).

O CD105 (Endoglina) é uma proteína transmembrana com grande expressão em células endoteliais humanas e está associada a proliferação celular endotelial, demonstra ser um potencial marcador para quantificar microvasos em vários tipos de tumores vasculares. Por meio de sua análise, é possível distinguir entre a

proliferação de células endoteliais e os vasos sanguíneos já pré-existentes (ANDRADE-SANTOS *et al.*, 2011; NAIR *et al.*, 2016). Esta proteína é um marcador de neoangiogênese mais específico e sensível, quando comparado com outros marcadores como CD31 e CD34, e apresenta especificidade para células endoteliais ativadas que participam da angiogênese tumoral (ESHGHYAR *et al.*, 2011). Sendo assim, por meio da expressão do CD105 podemos evidenciar e quantificar microvasos neoformados e o grau de proliferação celular endotelial por meio da quantificação percentual, da densidade e do volume microvascular (CARDOSO *et al.*, 2009; ANDRADE-SANTOS *et al.*, 2011)

Sabe-se que a LCCG é uma patologia que faz parte de um espectro de lesões que possuem características clínicas e histológicas semelhantes. Entre elas podemos citar o tumor de células gigantes (TCG), uma lesão de ossos longos, osteolítica, agressiva, que geralmente acomete a epífise de ossos longos, com ou sem extensão metafiseal (KUJAN *et al.*, 2015; YAMAMOTO *et al.*, 2017). Por apresentarem perfis imunoistoquímicos e histológicos semelhantes as LCCG, não se sabe ao certo se essas lesões são entidades separadas ou variantes da mesma doença, apesar da diversidade no comportamento clínico (KUJAN *et al.*, 2015). Resnick *et al.* (2010), após avaliar as características fenotípicas, clínicas e radiográficas de grupos de LCCG e TCG localizadas na região maxilofacial e no esqueleto axial respectivamente, concluíram que ambos os grupos apresentam lesões similares quanto aos aspectos avaliados e fazem parte do mesmo processo de doença.

Recentemente têm sido encontradas, por meio de imunoistoquímica, mutações gênicas nas proteínas histonas H3.3 de TCG que possuem valor diagnóstico para estas lesões (AMARY *et al.* 2017; LÜKE *et al.* 2017). Para investigar a mutação da histona H3.3 nos TCG, Amary *et al.* (2017), avaliaram 235 TCG e observaram que 90,6% das lesões apresentaram imunoreatividade nuclear para a mutação desta histona.

As histonas são uma família de proteínas com importante função no armazenamento e compactação do material genético no núcleo celular por meio dos nucleossomos. Dentre as diversas variantes, mutações na histona H3.3 foram evidenciadas em casos de condroblastoma, tumor de células gigantes e em gliomas pediátricos de alto grau (AMARY *et al.*, 2017). Especificamente no TCG, observou-se uma mutação no gene H3F3A da histona H3.3, mais especificamente no códon

G34 (Glicina; Aminoácido 34) que é alterado para G34W (Glicina; Aminoácido 34 Triptofano) por meio da modificação de um dos aminoácidos da sequência que traduz o G34 (KALLAPPAGOUDAR *et al.*, 2015). Esta mutação tem se tornado importante para o diagnóstico dos TCG, uma vez que estudos mostram alta especificidade da mutação da histona H3.3 em tumores de ossos longos (KALLAPPAGOUDAR *et al.*, 2015; AMARY *et al.*, 2017). O diagnóstico dessa mutação ou não na LCCG pode elucidar melhor a sua patogênese, uma vez que existe semelhança clínica e histológica com o tumor de células gigantes e poucos trabalhos que investigam, por meio de imunistoquímica, a mutação de H3.3 nas LCCG (AMARY *et al.*, 2017; YAMAMOTO *et al.*, 2017)

Diante do conhecimento atual existente sobre as LCCG, ainda podem ser encontradas algumas lacunas com referência a caracterização do aspecto vascular e pouca evidência sobre a correlação entre os marcadores angiogênicos e o comportamento biológico dessas lesões, bem como alterações gênicas como da histona H3.3 que possam estar associadas com as LCCG como observado no TCG.

Este trabalho é o primeiro a investigar conjuntamente a expressão de WT1, CD31 e CD105 na LCCG e sua associação com a agressividade das lesões, além de verificar a presença ou não de mutação da proteína histona H3.3 em LCCG agressivas e não agressivas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LESÃO CENTRAL DE CÉLULAS GIGANTES

As LCCG foram definidas por Jaffe (1953), como um granuloma reparador de células gigantes dos maxilares. Trata-se de uma lesão óssea benigna pouco frequente, podendo acometer o osso mandibular ou as maxilas, representando cerca de 7% de todos os tumores benignos dos maxilares (JAFFE, 1953; TRIANTAFILLIDOU *et al.*, 2011). São mais comumente vistos em crianças ou adultos jovens, e quase 65% dos casos ocorrem em mulheres (ETOZ *et al.*, 2019).

Estas lesões ocorrem com mais frequência na mandíbula e envolvem particularmente a região anterior, podendo se estender até os primeiros molares inferiores e cruzar a linha média mandibular com frequência (ROBERSON *et al.*, 1997; DE LANGE *et al.*, 2007; TRIANTAFILLIDOU *et al.*, 2011; VALENTINE & NELSON, 2011; JERKINS *et al.*, 2016; CHRCANOVIC *et al.*, 2018; HOSUR *et al.*, 2018; ETOZ *et al.*, 2019). Uma revisão de literatura realizada por Chrcanovic *et al.* (2018) envolvendo a análise de 2270 LCCG, observaram uma maior prevalência das LCCG no gênero feminino (60,8%) e na região mandibular (69,2%).

Podem se apresentar como uma tumefação assintomática, de crescimento lento ou como uma lesão agressiva com dor local, destruição da cortical óssea, reabsorções e deslocamentos radiculares, e recorrência após tratamentos por curetagem (SUN *et al.*, 2009; TRIANTAFILLIDOU, *et al.*, 2011; VALENTINE *et al.*, 2011; DOLANMAZ *et al.*, 2016; ETOZ *et al.*, 2019).

O aspecto radiográfico das LCCG não é patognomônico, entretanto, as lesões normalmente são bem definidas, exibem uma radiolucência unilocular ou multilocular e podem apresentar expansão e/ou fenestração do osso cortical (ETOZ *et al.*, 2019). Outras lesões podem apresentar características radiográficas semelhantes, e o diagnóstico diferencial das LCCG deve ser realizado com outras patologias localizadas nos maxilares, como o tumor marrom do hiperparatireoidismo, displasia fibrosa, cisto ósseo aneurismático, tumores de células gigantes, lesões fibro-ósseas, malformações vasculares e até mesmo com lesões neoplásicas malignas (DE LANGE *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2009; VALENTINE & NELSON, 2011; NAIDU *et al.*, 2014; DOLANMAZ *et al.*, 2016; ETOZ *et al.*, 2019).

Em um estudo retrospectivo realizado por Sun *et al.* (2009), aspectos clínicos e radiográficos foram investigados em 22 LCCG. Foi observado que havia uma predileção pelo gênero feminino (n=14) e a localização mandibular com aspecto radiográfico unilocular foram mais frequentemente observados. Do total, 10 apresentaram expansão de cortical e destas 09 tinham fenestração óssea associada. Não houve relatos de sintomatologia. Chrcanovic *et al.* (2018), observaram que a maioria das lesões relatadas na literatura eram assintomáticas (79,4%), com expansão óssea (91,7%) e com adelgaçamento das corticais ósseas (84,3%).

Do ponto de vista clínico e radiográfico, as LCCG podem apresentar comportamentos biológicos distintos e, dessa forma, são subdivididas em lesões agressivas e não agressivas, conforme descrito inicialmente por Chuong *et al.* (1986). As características de acordo com o comportamento biológico, agressivo ou não agressivo, estão sumarizadas no quadro 1.

Quadro 1. Características clínicas e radiográficas das LCCG agressivas e não agressivas de acordo com Chuong *et al.* (1986).

CARACTERISTICAS	NÃO AGRESSIVA	AGRESSIVA
Sintomatologia	Ausente ou mínima	Presente
Crescimento	Lento	Rápido
Corticais ósseas	Preservadas	Rompidas
Relação dentária	Sem alteração	Reabsorção / Deslocamento
Taxa de recidiva	Baixa	Alta

Fonte: Chuong *et al.* (1986).

Quanto a histomorfologia, as LCCG possuem um estroma fibroblástico altamente celularizado, composto por células fusiformes com alto percentual mitótico e células gigantes multinucleadas de morfologia variável (VALENTINE & NELSON, 2011; ETOZ *et al.*, 2019). Podem apresentar ossificação metaplásica e calcificação distrófica com maior frequência na periferia da lesão, além de alta densidade

vascular (DE LANGE *et al.*, 2007; VALENTINE & NELSON, 2011; ETOZ *et al.*, 2019).

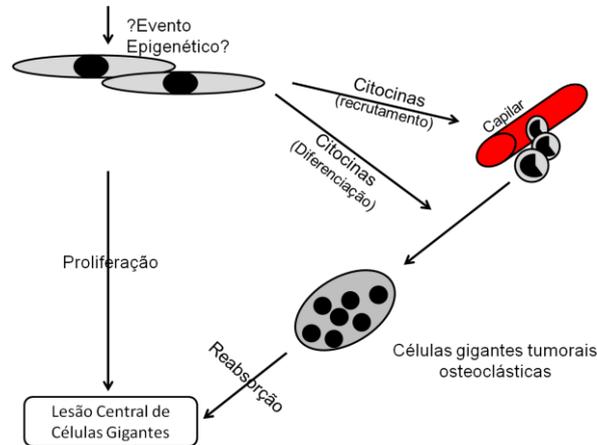
A histogênese da LCCG ainda é controversa, e as especulações quanto à possibilidade de representar um processo reativo inflamatório, vascular ou neoplásico ainda prevalecem na literatura científica (VERED *et al.*, 2006; REGEZI, 2004; PEACOCK *et al.*, 2012; ETOZ *et al.*, 2019). Conforme teorizado por Regezi (2004), grupos de LCCG com comportamento neoplásico se desenvolvem a partir de lesões reativas por meio de um evento epigenético que ocorre nas células mesenquimais fusiformes do osso, resultando num menor controle do ciclo celular e, conseqüentemente, na expressão de proteínas com potencial de recrutamento de monócitos para diferenciação em osteoclastos posteriormente.

A epigenética é definida como o estudo das alterações hereditárias na expressão gênica, sem alteração das sequências do DNA. Os padrões de genes epigenéticos possuem um papel importante em vários processos biológicos, incluindo o desenvolvimento embrionário, a impressão genômica e a inativação do cromossomo X. As interrupções desses processos levam a uma variedade de patologias, incluindo doenças metabólicas, autoimunes, desordens neurológicas e câncer. Os processos essenciais para a regulação epigenética são a metilação do DNA, a modificação da cromatina (alteração covalente no núcleo das histonas), posicionamento do nucleossomo (alterações físicas), e regulação gênica pós-traducional por meio de RNAs não-codificante. A desregulação desses processos resultam em função genética aberrante e expressão genética alterada, as quais irão contribuir na iniciação, desenvolvimento e progressão do câncer (KANWAL *et al.*, 2015).

Alguns mecanismos podem ser importantes para conceituar a patogênese das LCCG. Existe a hipótese de que as células gigantes sejam originadas de células mononucleares sanguíneas recrutadas pelas células fusiformes do estroma (REGEZI, 2004). A formação de osteoclastos envolve a interação entre células do estroma que expressam RANKL (ligante do receptor ativador para fator nuclear kappa β) e precursores de osteoclastos mononucleares (células sanguíneas mononucleares) que expressam RANK (receptor ativador para fator nuclear kappa β). A interação entre essas citocinas induzem a diferenciação de células mononucleares em osteoclastos, que após ativados e fusionados, darão origem às células gigantes osteoclásticas (DE LANGE *et al.*, 2007; ELIAS *et al.*, 2010;

VALENTINE & NELSON, 2011; AHMED & DUNLAP, 2016; HOSUR *et al.*, 2018) (Figura 1).

Figura 1. Esquema da patogênese da LCCG.



Fonte: Adaptado de Regezi (2004).

O osteoclasto é a célula responsável pela reabsorção óssea. Ele é derivado das células progenitoras hematopoiéticas que também dão origem aos monócitos e macrófagos. As citocinas e os fatores de crescimento cruciais para a diferenciação e a maturação dos osteoclastos em humanos incluem a interleucina (IL)-1, IL-3, IL-6, IL-11, TNF, fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (FSC-GM) e fator estimulante de colônias de macrófagos (FSC-M). Estes fatores atuam pela estimulação das células progenitoras de osteoclastos ou participando em um sistema parácrino, no qual osteoblastos e células do estroma da medula óssea desempenham um papel central. Este sistema parácrino é essencial para o metabolismo ósseo e seus mediadores incluem as moléculas RANK (receptor ativador para fator nuclear kappa β), RANKL (ligante do receptor ativador para fator nuclear kappa β) e osteoprotegerina (OPG). O RANK é um membro da família do TNF dos receptores expressos principalmente nas células da linhagem de macrófagos/monócitos como os pré-osteoclastos. Quando este receptor liga seu ligante específico (RANKL) através do contato célula a célula, se inicia a osteoclastogênese. O RANKL é produzido e expresso na membrana celular dos osteoblastos e células do estroma da medula óssea; seu principal papel no metabolismo ósseo é o estímulo para a formação, fusão, diferenciação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos (ROSENBERG, 2005).

Amaral *et al.* (2013) investigaram a expressão do gene e da proteína WWOX em LCCG agressivas e não agressivas. O gene WWOX é um gene pró-apoptótico e a redução ou a perda da sua expressão tem sido evidenciada em vários tumores. A proteína WWOX interage com o p73, um membro da família p53, e induz a apoptose celular. A expressão aumentada de WWOX em lesões não agressivas fortalece a hipótese de que as lesões agressivas possam representar um subconjunto neoplásico dentro do grupo das LCCG.

Gomes *et al.* (2018), analisaram 58 espécimes de células gigantes usando sequenciamento de próxima geração ou sequenciamento guiado. Encontraram mutações somáticas, heterozigóticas e do tipo “*gain-of-function*”, na qual o produto genético alterado possui uma nova função molecular ou um novo padrão de expressão gênica, nos genes KRAS, FGFR1 e TRPV4. Os resultados demonstraram que TRPV4, KRAS e as mutações do FGFR1 convergem na ativação da sinalização da via MAPK nas LCCG. A ativação dessa via por qualquer desses genes é invariavelmente associada a alterações esqueléticas, entre elas a LCCG.

Vered *et al.* (2006), avaliaram a atividade angiogênica nas LCCG por meio da expressão de dois indutores de angiogênese, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), e concluíram que apesar da presença de atividade angiogênica de baixo grau, as LCCG não podem ser definidas como lesões vasculares proliferativas.

Em contrapartida, Peacock *et al.* (2012) avaliaram os mesmos fatores de crescimento nas LCCG agressivas e não agressivas, acrescido da análise dos marcadores CD31 e CD34, cuja função é evidenciar a presença de células endoteliais, e observaram que a vascularização e o nível de angiogênese estavam diretamente relacionados com a agressividade das lesões, fortalecendo a teoria de que as LCCG são lesões vasculares proliferativas.

Dentre as modalidades de tratamento, o cirúrgico ainda é o mais utilizado. As lesões não agressivas possuem baixa expectativa de recidiva e podem ser tratadas por meio de curetagem (KABAN *et al.*, 2007). As lesões agressivas possuem alta taxa de recidiva e são tratadas por meio de ressecção em bloco ou, de forma menos invasiva, por curetagem associada a terapias farmacológicas adjuvantes como a administração intralesional de corticosteroide, calcitonina sistêmica ou em spray nasal, interferon – α , além de bisfosfonatos e anticorpos monoclonais como o

Alendronato e o Denosumab, respectivamente (DE LANGE *et al.*, 2007; KABAN *et al.*, 2007; O'CONNELL *et al.*, 2015).

Triantafillidou *et al.* (2001), realizaram um estudo retrospectivo de 17 LCCG tratadas por meio de curetagem e obtiveram remissão completa de 15 lesões. As duas lesões recorrentes foram tratadas por meio da aplicação de spray nasal de calcitonina e não apresentaram recidiva posterior. Os autores propõem o tratamento cirúrgico conservador, por meio de curetagem, principalmente para pacientes jovens. Para lesões agressivas, a suplementação com calcitonina via nasal poderá oferecer bons resultados.

Já Chrcanovic *et al.* (2018), após realizarem uma análise de 2270 casos de LCCG, observaram diferenças estatisticamente significantes em relação a recidiva de lesões agressivas tratadas por meio de curetagem. Das lesões agressivas tratadas, 37,2% sofreram recidiva, enquanto 9% das não agressivas recidivaram.

2.2 TUMOR DE CÉLULAS GIGANTES X LCCG

O tumor de células gigantes (TCG) é um tumor ósseo primário, benigno, localmente agressivo, que normalmente se desenvolve como lesão única, primariamente intramedular nas epífises de ossos longos, acometendo predominantemente a região distal do fêmur e rádio, e regiões proximais da tíbia e úmero (AMARY *et al.*, 2017). Representam cerca de 5% de todos os tumores esqueléticos e menos de 1% ocorrem no crânio, onde afetam preferencialmente o osso esfenoide e temporal (SCOTTO DI CARLO *et al.*, 2018). No esqueleto axial, o sacro proximal é a localização mais comum do TCG, podendo acometer também os pequenos ossos das mãos e pés, e ossos sesamóides como a patela (AMARY *et al.*, 2017). Geralmente ocorre quando a placa de crescimento está fechada e, portanto, é frequentemente observada no esqueleto de indivíduos adultos com pico de incidência na terceira e quarta década de vida e uma ligeira predominância no gênero feminino (1,5:1). Relatos de TCG no esqueleto imaturo são extremamente raros (AMARY *et al.*, 2017; SCOTTO DI CARLO *et al.*, 2018).

Do ponto de vista radiográfico, são lesões expansivas, osteolíticas, podendo apresentar margens escleróticas. Embora apresentem um baixo potencial de metástase, os TCG podem recidivar com grande frequência, normalmente entre 15% a 50% dos casos após tratamento cirúrgico com curetagem. Metástases pulmonares

podem se desenvolver em 2% dos casos, geralmente 3 a 4 anos após o diagnóstico. Portanto, uma ressecção completa acompanhada de terapia adjuvante para prevenir a recorrência do tumor podem ser necessárias (NOHR *et al.*, 2017; RIGHI *et al.*, 2017; SCOTTO DI CARLO *et al.*, 2018).

Os diagnósticos diferenciais incluem numerosas lesões ósseas ricas em osteoclastos: condroblastoma, fibroma não ossificante, cisto ósseo aneurismático primário, lesões de células gigantes dos pequenos ossos, lesão central de células gigantes, tumor marrom do hiperparatireoidismo e tumor de células gigantes tenosinovial com infiltração óssea (PRESNEAU *et al.*, 2015; AMARY *et al.*, 2017).

Os TCG são compostos por células gigantes multinucleadas semelhantes a osteoclastos, uniformemente distribuídas por todo o estroma e por células mononucleares ovóides ou fusiformes. Apesar das células gigantes serem uma parte significativa do tumor, as células mononucleares mitoticamente ativas do estroma são as que constituem o verdadeiro componente neoplásico (CLEVEN *et al.*, 2015; NOHR *et al.*, 2017; RIGHI *et al.*, 2017; SCOTTO DI CARLO *et al.*, 2018).

Ainda é objeto de grande discussão na literatura, se as LCCG e o TCG são entidades separadas ou variantes da mesma doença. Numa tentativa de distinguir as LCCG dos TCG, Jaffe (1953), introduziu pela primeira vez o termo “*granuloma reparador de células gigantes*”, que posteriormente caiu em desuso devido à natureza destrutiva das lesões (ABRAMS & SHEAR, 1974; AUCLAIR *et al.*, 1988; KUJAN *et al.*, 2015).

Abrams e Shear (1974), fizeram uma comparação histológica entre 10 espécimes de LCCG e 10 de TCG e observaram que as células gigantes das lesões dos maxilares possuíam menos núcleos e um tamanho menor quando comparadas as células das lesões de ossos longos. Concluíram, portanto, que as LCCG e o TCG são entidades distintas e que, mesmo assim, algumas lesões podem ser indistinguíveis umas das outras.

Segundo Regezi (2002), apesar de as LCCG e os TCG possuírem características histopatológicas que se sobrepõem, fatores tais como células gigantes de grande tamanho com grande quantidade de núcleos agregados centralmente ou células gigantes com distribuição difusa, alta celularidade do estroma e necrose são sugestivas de TCG.

Já Auclair *et al.* (1988) e Gomes *et al.*, (2014) afirmam que as LCCG e o TCG representam uma variação da mesma doença, compartilham de características

microscópicas semelhantes, mas que diferem em relação a localização e a faixa etária acometida.

2.3 MARCADORES ANGIOGÊNICOS E MUTACIONAL

2.3.1 WT1

A proteína WT1 tem sido identificada em um grande número de lesões vasculares malignas e tumores sólidos (GALFIONE *et al.*, 2014). Pode estar relacionada a uma transição descontrolada de células epiteliais para mesenquimais e também possui um papel importante na angiogênese por meio da regulação do VEGF (NETTO *et al.*, 2012; GALFIONE *et al.*, 2014).

A expressão do WT1 é observada nas células endoteliais durante a angiogênese e é um marcador útil na diferenciação entre tumores vasculares proliferativos e malformações vasculares (AL DHAYBI *et al.*, 2010; NETTO *et al.*, 2012; GALFIONE *et al.*, 2014).

No intuito de verificar a natureza não-proliferativa de linfangiomas orais, Netto *et al.* (2012), avaliaram a expressão do WT1 em 17 lesões e observaram que nenhuma apresentou marcação positiva. Isto confirma a natureza não-proliferativa dos linfangiomas e reforça a idéia de que essas lesões são caracterizadas pela dilatação dos vasos linfáticos sem proliferação endotelial significativa.

Timár *et al.* (2005), estudaram a expressão de WT1 em 42 espécimes de pele humana apresentando proliferações endoteliais e tumores. O WT1 foi expresso no citoplasma em 3 de 10 hemangiomas, 7 de 18 Sarcomas de Kaposi e em 7 de 8 angiossarcomas. Foi inferido que a expressão da proteína WT1 é mantida durante a angiogênese, e pode reaparecer durante a neoangiogênese reparadora ou em tumores endoteliais benignos ou malignos.

Al Dhaybi *et al.* (2010), realizaram um estudo envolvendo 126 lesões vasculares, sendo 65 tumores vasculares e 61 malformações vasculares, e mostraram que a expressão imunoistoquímica do WT1 pode ser útil na distinção entre lesões proliferativas neoplásicas e malformações vasculares. Todos os tumores vasculares obtiveram expressão citoplasmática em células endoteliais e apenas 3 malformações mostraram expressão positiva ao WT1. Dessa forma, a expressão poderá ajudar no diagnóstico e na terapia adequada de lesões

proliferativas vasculares ou evitar terapias sistêmicas desnecessárias na ocorrência de malformações vasculares. Lesões proliferativas tiveram expressão positiva para a WT1, enquanto as malformações vasculares não manifestam a expressão da WT1.

2.3.2 CD31

O CD31, também conhecido como molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1), é considerada um dos marcadores de células endoteliais mais importantes, evidenciando leitos vasculares tanto em tecidos normais como nos neoplásicos (PEACOCK *et al.*, 2012). Está presente na superfície de plaquetas, monócitos, macrófagos e neutrófilos e é um dos fatores de adesão entre células endoteliais durante a angiogênese. Possui um importante papel na adesão entre as células endoteliais e entre as células inflamatórias durante a inflamação, facilitando a migração dos leucócitos. (DE YOUNG *et al.*, 1998; PUSZTASZERI *et al.*, 2006; KOUHSOLTANI *et al.*, 2016).

Peacock *et al.* (2012), avaliaram a vascularização e a atividade angiogênica de 14 LCCG por meio da expressão de VEGF, bFGF, além da contagem de vasos sanguíneos marcados por campo utilizando o CD31 e CD34. Nesse estudo eles encontraram uma expressão aumentada de todos os marcadores, dando suporte a teoria de que um componente de proliferação vascular na LCCG possa ser responsável pela sua agressividade clínica. A angiogênese e a vascularização aumentadas podem permitir um maior recrutamento e diferenciação de células hematopoiéticas em osteoclastos, levando a uma osteólise mais rápida e ao aumento da lesão. Assim, a caracterização de marcadores angiogênicos na LCCG (VEGF e bFGF) e endoteliais (CD31 e CD34) podem ser úteis para definir o comportamento biológico da lesão.

Em uma avaliação da expressão de CD31 em 18 LCCG (10 não agressivas e 8 agressivas) realizada por El-Attar e Wahba (2016), não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Investigaram ainda a expressão de Ki67, CD68 e P53 por meio de imunistoquímica e concluíram que o Ki67 e o P53 podem ser marcadores úteis para identificar LCCG agressivas, uma vez que observaram uma expressão maior e estatisticamente significativa de ambos em lesões agressivas. Não houve diferença de expressão de CD31 e CD38 entre os grupos de lesões agressivas e não agressivas.

Já Ravazi e Yahyaabadi (2018), avaliaram a expressão de CD31 e Ki67 em 25 LCCG agressivas e 25 não agressivas, por meio de imunistoquímica, e os resultados mostram uma diferença significativa na expressão de CD31 entre lesões agressivas e não agressivas ($p=0,003$). Isso indica que pode existir uma relação positiva entre características clínicas e histopatológicas nas LCCG, e que o comportamento biológico pode ser previsto com base no número de vasos sanguíneos presentes.

2.3.3 CD105

O CD105, também conhecido como endoglina, é uma glicoproteína transmembrana, de expressão induzida por hipóxia, associada a proliferação de células endoteliais (NAIR *et al.*, 2016). Possui receptores para fatores de crescimento transformadores (TGF), o TGF-1 e o TGF-3, modula a sinalização destes e da angiogênese por meio da regulação da proliferação, diferenciação e migração de células endoteliais (ESHGHYAR *et al.*, 2011). É um potente fator que se expressa em células endoteliais ativadas durante a angiogênese, além de ser um marcador específico de neovascularização mais aceito e preciso em relação a outros marcadores endoteliais como o CD31 e o CD34 (CARDOSO *et al.*, 2009; ESHGHYAR *et al.*, 2011; ANDRADE-SANTOS *et al.*, 2011; DEL CARMEN GONZÁLEZ-GALVÁN *et al.*, 2016; NAIR *et al.*, 2016).

Diferentemente dos marcadores CD31 e CD34, o CD105 pode ser minimamente expresso ou não ser evidenciado na vascularização normal. Por meio da sua expressão, é possível distinguir entre células endoteliais em proliferação e vasos sanguíneos pré-existentes (NAIR *et al.*, 2016). Vários estudos enfatizam o envolvimento do CD105 na formação de vasos sanguíneos e sua utilidade como um potente marcador para a quantificação de microvasos em diversos tipos de tumores como os carcinomas de mama, adenocarcinomas de esôfago, entre outros (CARDOSO *et al.*, 2009; ESHGHYAR *et al.*, 2011; ANDRADE-SANTOS *et al.*, 2011; BASNAKER *et al.*, 2014; DEL CARMEN GONZÁLEZ-GALVÁN *et al.*, 2016; NAIR *et al.*, 2016).

Segundo Del Carmen González-Galván (2016), a densidade microvascular (DMV) fornecida pela expressão do CD105, é um parâmetro histomorfológico útil para a avaliar a angiogênese tumoral. É considerada um indicador para crescimento

tumoral e tem sido correlacionada com o comportamento agressivo de alguns tumores, como as variantes unicística e sólida dos ameloblastomas. O CD105 pode ser usado para estudar os efeitos antineoplásicos de terapias antiangiogênicas, mesmo em casos de tumores odontogênicos recorrentes ou agressivos (DEL CARMEN GONZÁLEZ-GALVÁN *et al.*, 2016).

O CD105 pode ser útil como marcador preditivo de malignidade. Basnaker *et al.* (2014), avaliou a expressão de CD105 em 20 pacientes com mucosa oral sadia, 20 usuários de tabaco com mucosa oral clinicamente sadia e em 20 lesões com diagnóstico prévio de carcinoma de células escamosas, e observou que a expressão do CD105 foi positiva em 65% dos usuários de tabaco. De forma semelhante, a expressão de CD105 em carcinomas de células escamosas foi observada em 13 casos (65%), indicando que o CD105 é aumentado em condições displásicas como os presentes na mucosa oral do grupo de tabagistas e pode também ser atribuído a neoangiogênese local.

Falci *et al.* (2014), avaliaram a expressão de FASN, CD34, CD105 e D2-40 em lesões periféricas e centrais de células gigantes, e observaram que, apesar do nível de expressão semelhante entre os marcadores em ambas as lesões, a expressão do CD105 suporta a presença de uma atividade angiogênica e de remodelação tecidual nas LCCG. Afirmam ainda, que estudos posteriores são necessários para verificar e comparar a expressão de CD105 em LCCG agressivas e não agressivas.

Nair *et al.* (2016), avaliaram a expressão de CD105 e TGF- β 1 em um total de 50 espécimes com carcinoma de células escamosas e observaram que 79,4% das células endoteliais expressaram positivamente ambos os marcadores e verificaram uma correlação positiva entre a expressão de CD105 e o estadiamento tumoral. Concluíram que o CD105 pode ser usado isoladamente como marcador prognóstico para carcinoma de células escamosas e afirmaram que ele é um dos receptores do TGF- β 1 nas células endoteliais bem como induzem a via angiogênica tumoral.

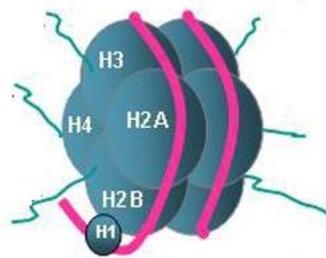
2.3.4 Histona H3.3

A cromatina, que dá origem aos cromossomos, é composta de nucleossomos que por sua vez são formados pelo conjunto de octâmeros de histona com um núcleo tetramérico estável de histonas H3 e H4, rodeados por dois dímeros mais

lábeis de histona, H2A e H2B. Cada octâmero de histona é envolvido por DNA, facilitando sua compactação e regulando o acesso de fatores regulatórios (Figura 2). As histonas têm importância fundamental para a regulação da estabilidade do genoma e o controle transcricional. Tem sido destacada na literatura pela identificação frequente de mutações em enzimas modificadoras de cromatina nos genomas com câncer (KALLAPPAGOUDAR *et al.*, 2015).

Figura 2. Desenho esquemático da localização da histona H3 no nucleossomo e na cromatina.

A



B



(A) Histona H3 na formação do nucleossomo. (B) Fibra de cromatina resultante do conjunto de DNA compactado por meio das histonas. **Fonte:** Adaptado de Copray *et al.* (2009).

As histonas são proteínas importantes para a compactação do DNA. Dentre as variantes da histona H3, a histona H3.3 é codificada por dois genes, H3F3A no cromossomo 1 e H3F3B no cromossomo 7. Behjati *et al.* (2013), foram os primeiros a detectar, por meio de sequenciamento genético, uma mutação na histona H3.3 com grande especificidade para o TCG a qual ocorreu com uma frequência acima de 92% dos tumores analisados. A mutação é restrita às células fusiformes neoplásicas no TCG, enquanto as células gigantes osteoclásticas entremeadas no estroma são negativas para essa mutação. A mutação localizada no gene H3F3A é responsável por uma alteração da histona H3.3, especificamente para o códon p.Gly34Trp (G34W).

Recentemente, um anticorpo monoclonal foi desenvolvido visando a detecção do sítio mutacional G34W da histona H3.3 por meio da técnica de imunistoquímica,

conforme descrito por Lüke *et al.* (2017). Os autores examinaram o potencial desse anticorpo como auxiliar para o diagnóstico do TCG com mutação do gene H3F3A e investigaram a expressão desse anticorpo em 23 TCG que haviam sido previamente detectados por PCR com mutação do gene H3F3A. Investigaram também a presença dessa mutação em lesões ricas em células gigantes como o tumor marrom do hiperparatireoidismo, cisto ósseo aneurismático, condroblastoma, fibroma não ossificante, displasia fibrosa, tumor de células gigantes tenosinovial, sarcoma rico em células gigantes e osteossarcoma. A mutação do gene H3F3A foi observada em todos os casos de TCG, mais especificamente nas células mononucleares, enquanto as células multinucleadas se mostraram negativas para a mutação. Já as lesões ricas em células gigantes se mostraram todas negativas para a mutação. Estes resultados fortalecem a utilização desse anticorpo por meio de técnica imunohistoquímica no diagnóstico diferencial entre TCG e lesões ricas em células gigantes.

Segundo Gomes *et al.* (2014), os TCG são encontrados ocasionalmente nos maxilares e algumas lesões podem ser diagnosticadas de forma equivocada como LCCG agressiva. Dessa forma, a detecção de marcadores moleculares pode ser útil para o diagnóstico diferencial entre essas lesões, uma vez que o TCG e a LCCG possuem características clínicas, radiográficas e histopatológicas semelhantes. Partindo deste referencial, os autores avaliaram 9 LCCG por meio de sequenciamento genético direto e não encontraram mutação do H3F3A nos espécimes analisados, sugerindo que, apesar da pequena quantidade de casos, a investigação da mutação é importante para o diagnóstico diferencial entre TCG e LCCG.

Presneau *et al.* (2015) afirmaram que apesar dos TCG apresentarem sinais clínicos, radiográficos e histológicos bem característicos, algumas lesões podem ter um diagnóstico desafiador, principalmente nas pequenas biópsias por agulha fina. Do ponto de vista histológico, o TCG pode apresentar algumas sobreposições com outras lesões, entre elas a LCCG. Com base nisso, eles submeteram 5 espécimes de TCG a um mapeamento completo do genoma, além de análise genética direcionada para o rearranjo de H3F3A em 91 TCG e 78 LCCG. O mapeamento evidenciou a mutação de H3F3A G34W nas 5 TCG, a análise genética direcionada encontrou mutação do mesmo gene em 83 dos 91 tumores analisados. Em contrapartida, nenhuma mutação foi encontrada na análise genética das LCCG.

Amary *et al.* (2017), avaliaram a expressão da mutação da H3.3 G34W, por meio de imunohistoquímica, em 235 TCG e em 750 lesões que podem mimetizar o tumor, entre elas 99 LCCG. Após a análise, 213 (90,6%) dos TCG apresentaram forte expressão nuclear para o H3.3 G34W exclusivamente nas células mononucleares. As LCCG não apresentaram expressão para mutação da histona H3.3.

3 JUSTIFICATIVA

As LCCG são lesões que acometem o complexo maxilo-mandibular e são responsáveis por grandes destruições ósseas, levando a tratamentos cirúrgicos agressivos que podem gerar sequelas e deformidades. A caracterização do comportamento biológico pode influenciar diretamente na escolha do tratamento apropriado, seja ele mais ou menos invasivo. A classificação das lesões em agressivas e não agressivas tem sido realizada apenas pela avaliação de dados clínicos e radiográficos, de acordo com Chuong *et al.* (1986). Não existem marcadores moleculares definidos que possam contribuir para uma caracterização adequada da agressividade dessas lesões.

É do conhecimento que a vascularização e a angiogênese são fatores importantes na oxigenação, nutrição e, conseqüente, na proliferação dos tecidos neoplásicos (GADBAIL *et al.*, 2011). A LCCG são lesões que possuem uma intensa rede vascular e podem evoluir de forma agressiva, causando grande osteólise, expansões ósseas e reabsorções radiculares (KABAN *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2015; NAIR *et al.*, 2016). Diante disso, pode ser hipotetizado que a proliferação aumentada de vasos sanguíneos possa estar relacionada a uma maior agressividade das LCCG.

As LCCG possuem características clínicas e histológicas que são semelhantes as encontradas nos TCG. A mutação gênica da proteína histona H3.3 tem sido recentemente encontrada por meio de imunistoquímica em TCG e, até o momento foi pouco explorada na literatura com relação a LCCG.

A investigação de marcadores angiogênicos nas lesões agressivas e não agressivas poderão contribuir para uma diferenciação mais precisa do comportamento biológico das LCCG e direcionar o tratamento a ser instituído, auxiliando na indicação de terapias menos agressivas por meio da utilização de terapias antiangiogênicas, de forma a reduzir a morbidade do tratamento realizado. Além disso, a investigação da mutação da histona H3.3 nas LCCG poderá direcionar para futuras pesquisas em relação a patogênese das LCCG e contribuir para o estabelecimento do diagnóstico diferencial entre TCG e lesões de células gigantes quando presente nos ossos gnáticos, além da possibilidade de diferenciar lesões agressivas de não agressivas, caso seja detectada.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar comparativamente o perfil angiogênico (WT1, CD31, CD105) e a presença de mutação gênica (histona H3.3 G34W) nas LCCG agressivas e não agressivas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a expressão, por meio da imunistoquímica, dos marcadores angiogênicos CD105, CD31 e WT1 em LCCG agressivas e não agressivas
- Investigar a expressão, por meio da imunistoquímica, de histona H3.3 H3F3A G34W em LCCG agressivas e não agressivas.
- Correlacionar a expressão de marcadores angiogênicos com o comportamento biológico das lesões.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo coorte retrospectivo foi desenvolvido no Laboratório de Imunoistoquímica e análise de saliva da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO/UFG). Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG – protocolo n.º. 3.179.567/2019 (Anexo).

5.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA

A amostra inicial consistiu de 52 espécimes diagnosticados previamente por meio dos exames clínico, radiográfico, anatomopatológico e laboratoriais, obtidos dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da FO/UFG, entre os anos de 1998 a 2018. Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, a amostra final do estudo consistiu de 38 espécimes. Os critérios de inclusão foram: blocos com espécimes teciduais de LCCG preservados, LCCG primárias confirmadas pelo exames anatomopatológico e laboratorial, presença de dados clínicos e radiográficos adequados para a definição da agressividade da lesão. Os critérios de exclusão foram: lesões com aspecto histológico semelhante as LCCG, como querubismo e tumor marrom do hiperparatireoidismo, LCCG submetidas a terapia prévia e/ou recorrentes.

Os dados clínico (idade, gênero, localização, tempo de evolução e sintomatologia), radiográficos e histopatológicos foram coletados dos registros nos prontuários. Por meio da análise dos dados clínicos e dos exames de imagens, as lesões foram classificadas em grupos de lesões agressivas e não agressivas, conforme os parâmetros de classificação propostos por Chuong *et al.* (1986), quando identificadas, no mínimo, três características para o enquadramento em cada grupo. As lesões agressivas apresentam sintomatologia, crescimento rápido, rompimento da cortical óssea, reabsorção e deslocamento dentários e alta taxa de recorrência após curetagem. Já as lesões não agressivas são assintomáticas, de crescimento lento, com ausência de rompimento ou reabsorção das corticais ósseas e baixa taxa de recorrência. Após a aplicação dos parâmetros de classificação de Chuong *et al.* (1986), 9 LCCG foram classificadas como agressivas e 29 como não agressivas.

5.2 TÉCNICA DA HEMATOXILINA E EOSINA (HE)

Para análise qualitativa e revisão do diagnóstico dos espécimes foi empregada a técnica histoquímica de rotina Hematoxilina e Eosina - HE. As amostras disponíveis de blocos parafinados contendo os espécimes foram seccionadas, por meio de um micrótomo (Leica RM2165), com cortes de 5µm, dispostas sobre lâminas de vidro e coradas, possibilitando a caracterização microscópica dos espécimes e confirmação do diagnóstico por um patologista bucal experiente.

5.3 TÉCNICA DA IMUNOISTOQUÍMICA

Todos os espécimes foram submetidos a cortes seriados, com 3µm de espessura, dispostos em lâminas silanizadas e desparafinizados em estufa a 50°C por 30 minutos. A antigenicidade foi recuperada com uso de solução de TRIS em banho-maria.

Por meio do Sistema de Detecção Novolink (Leica Biosystems, UK), e após a lavagem das lâminas com solução TRIS salina (TBS), os cortes foram incubados em peróxido de hidrogênio a 3%, para bloqueio da peroxidase endógena, em seguida com reagentes bloqueadores de proteínas, e posteriormente com anticorpos primários anti-WT1 (Clone: C-19, Santacruz), anti-CD31 (Clone: ab28364, Abcam), anti-CD105 (Clone: A-8, Santacruz) e anti-Histona H3.3 G34W (Clone: RM263, RevMab Biosciences) diluídos em solução salina tamponada (PBS), durante 8 horas a 4°C.

Soluções com anticorpos secundários ligados a polímero e solução reveladora de diaminobenzidina 3,3' (DAB) foram utilizados nos cortes após incubação com os anticorpos anti-WT1, CD31, CD105 e Histona H3.3 G34W. Os tecidos foram contra corados com hematoxilina por 15 minutos. Após serem lavadas com água corrente durante 5 minutos, as lâminas foram desidratadas com álcoois, passadas em xilol e montadas com solução de resina não aquosa (Entellan-Mikroskopie-Merck). Os tempos de exposição antigênica dos anticorpos primários e de revelação pelo DAB foram padronizados previamente. As características, atividades de cada marcador e os parâmetros padronizados se encontram resumidas no Quadro 2.

Quadro 2. Características dos anticorpos utilizados para o estudo.

Anticorpo	anti-WT1 (C-19)	anti-CD31 (ab28364)	anti-CD105 (A-8)	anti-Histona H3.3 G34W (RM263)
Fabricante	Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA	Abcam, Cambridge, Reino Unido	Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA	RevMab Biosciences, CA, EUA
Diluição	1:100	1:1000	1:1000	1:1000
Controle Positivo	Granuloma Piogênico	Granuloma Piogênico	Granuloma Piogênico	Tumor de células gigantes
Tempo no DAB	30''	30''	30''	30''
Atividade	(+) Tumores e proliferações vasculares (-) Malformações vasculares	(+) Células endoteliais plaquetas e leucócitos	(+) Células endoteliais proliferativas (-) Células endoteliais pré- existentes	(+) Tumor de células gigantes
Marcação Celular	Citoplasma	Membrana	Citoplasma	Núcleo

Fonte: Próprio autor.

Na avaliação quantitativa, foram investigadas as expressões dos anticorpos anti-WT1, anti-CD31 e anti-CD105 em 9 LCCG agressivas e 29 não agressivas para caracterizar o perfil angiogênico e a natureza vascular proliferativa das lesões, com granulomas piogênicos como controle positivo. A expressão de células com mutação de Histona H3.3 foram investigadas em LCCG agressivas e não agressivas tendo como controle positivo 02 casos de TCG. A associação da expressão destes anticorpos foi investigada nos dois grupos de LCCG para verificar a relação da angiogênese, padrão de vascularização e possível mutação.

A avaliação da expressão dos marcadores foi realizada cegamente, independente do grupo de LCCG, por um examinador devidamente treinado e cada lâmina foi avaliada como um todo, utilizando-se um microscópio óptico inicialmente com ampliação de 100x, obtida por uma lente objetiva de 10x, para selecionar os campos de análise, e em seguida quantificados em um aumento de 400x. Para a quantificação, uma lente com retículo de integração quadriculado com área de

0,0961 mm² (4740680000000 – Netzmikrometer x12.5; Carl Zeiss, Alemanha) foi empregada e a contagem iniciada pelo campo mais superior à esquerda.

Os espécimes com expressão positiva para o WT1 foram avaliados por método quantitativo adaptado de Tobón-Arroyave *et al.* (2005). As células mononucleares e gigantes, expressas de forma positiva e negativa, foram quantificadas em 5 campos consecutivos, iniciando pelo campo com expressão mais significativa (“hot spot”) selecionado em um aumento de 100x. O número de células positivas foi dividido pelo número total de células de cada campo e um percentual da média dos 5 campos definiu a expressão estimada do marcador para cada amostra. Além disso, cada espécime foi quantificado, por meio de escores, quanto a proporção de células expressas e a intensidade da coloração, conforme sumarizadas no quadro 3.

Um escore de distribuição de intensidade de coloração (DIC) foi dado pela multiplicação entre o escore de proporção de células expressas e o de intensidade de expressão. A média do escore DIC dos 5 campos forneceu o escore DIC do espécime.

Quadro 3. Quantificação do WT1

	Escore	Proporção de células expressas	Intensidade de expressão
WT1	0	0%	Ausente
	1	< 25%	Fraca
	2	25 – 50%	Moderada
	3	> 50%	Intensa

Fonte: Adaptado de Tobón-Arroyave *et al.* (2005)

As expressões do CD31 e CD105 foram investigadas, de acordo com o proposto por Del Carmen González-Galván *et al.* (2016). Uma seleção aleatória de cinco áreas mais representativas e com maior expressão dos anticorpos (“hot spots”) foi realizada utilizando ampliação de 100x. Os microvasos corados positivamente foram quantificados manualmente utilizando uma ampliação de 400x. Grupos de células sem lúmen fortemente expressos pelas proteínas CD31 e CD105 também foram contabilizados como microvasos. A DMV do CD31 e do CD105 foram obtidas

pela média da contagem de microvasos de 5 campos dividida pela área do retículo (microvasos / mm²).

A expressão da Histona H3.3 mutada foi evidenciada pela marcação nuclear e, semelhante a análise do WT1 e conforme descrito por Tobón-Arroyave *et al.* (2005), foi quantificada e subdividida em escores de acordo com a proporção de células expressas e a intensidade de expressão (Quadro 4). Os núcleos expressos positivamente e os não expressos foram quantificados em 5 campos consecutivos, e o percentual dos núcleos positivos foi obtido para o enquadramento nos escores de quantidade e intensidade de expressão dos núcleos marcados.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Para a verificação da normalidade dos dados utilizamos o teste de Kolmogorov-Smirnov e para a realização dos testes de hipótese foi adotado o nível de significância de 5% para a rejeição da hipótese nula. Utilizamos o teste não-paramétrico de Mann Whitney para comparação entre as amostras, teste de correlação de Spearman para correlação entre expressão dos marcadores e a agressividade das lesões, e teste do Qui-quadrado para comparação entre os grupos e as variáveis categóricas na análise descritiva dos espécimes. A diferença entre os grupos foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS ESPÉCIMES

Cinquenta e dois espécimes foram selecionados para o estudo, e destas 38 espécimes constituíram as amostras que atenderam aos critérios de inclusão do estudo.

Em relação aos dados clínico-radiográficos, foi observada uma concordância com dados da literatura (ROBERSON *et al.*, 1997; DE LANGE *et al.*, 2007; TRIANTAFILLIDOU *et al.*, 2011; VALENTINE *et al.*, 2011; JERKINS *et al.*, 2016; HOSUR *et al.*, 2018; ETOZ *et al.*, 2019). A mandíbula foi a localização de maior frequência (65,8%) e o gênero feminino foi mais acometido (73,7%). A mediana de idade encontrada para as lesões agressivas foi de 16 anos e 25 anos para as não agressivas. Lesões assintomáticas (73,7%), com corticais preservadas (60,5%) e sem reabsorção dentária (76,3%) foram as características radiográficas mais evidentes. Do total de casos avaliados, apenas 3 sofreram recorrência (7,8%). A Tabela 1 sumariza os dados clínicos-radiográficos.

Tabela 1. Dados clínico-radiográficos das LCCG

Lesão Central de Células Gigantes				
	Agressivas n=9(%)	Não agressivas n=29(%)	Total n=38(%)	Valor de p
Idade[†]				
Mediana (Q25 – Q75)	16 (12,50 – 22,50)	25 (12,50 – 42,50)	24 (12,75 – 37,755)	0,53 ^a
Sexo				
Feminino	7 (77,8)	21 (72,4)	28 (73,7)	0,75 ^b
Masculino	2 (22,2)	8 (27,6)	10 (26,3)	
Localização				
Maxila	0 (0)	13 (44,8)	13 (34,2)	0,001 ^b
Mandíbula	9 (100,0)	16 (55,2)	25 (65,8)	
Sintomatologia				
Sim	9 (100,0)	1 (0,5)	10 (26,3)	<0,001 ^b
Não	0 (0)	28 (96,5)	28 (73,7)	
Reabsorção Dentária				
Sim	9 (100,0)	0 (0)	9 (23,7)	<0,001 ^b
Não	0 (0)	29 (100,0)	29 (76,3)	
Cortical Óssea				
Preservada	1 (11,1)	22 (75,9)	23 (60,5)	<0,001 ^b
Expandida	0 (0)	7 (24,1)	7 (18,4)	
Rompida	8 (88,9)	0 (0)	8 (21,1)	
Tempo de evolução*				
Mediana (Q25-Q75)	16 (3,5 – 45)	8 (4 – 24)	8 (4 – 24)	0,68 ^a

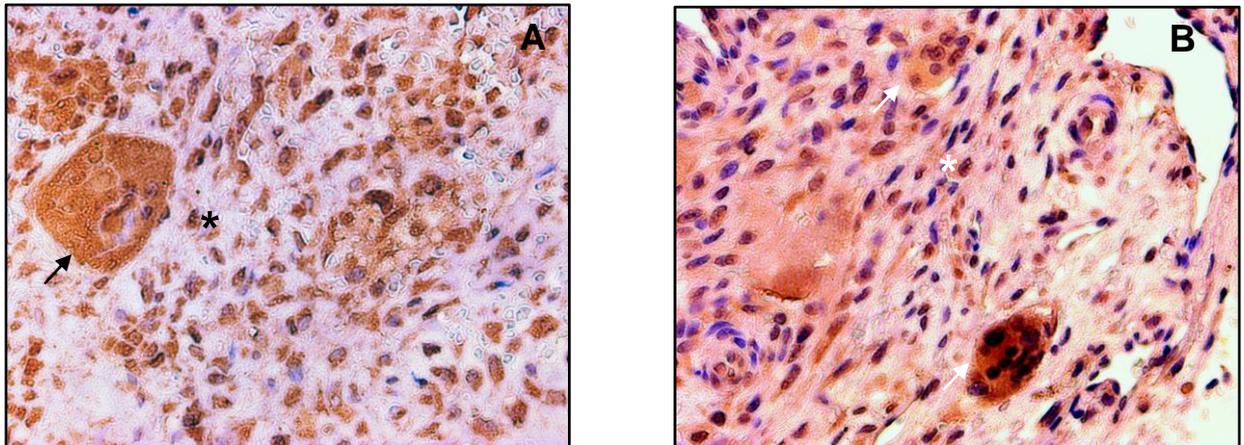
^aTeste de Mann-Whitney. ^bTeste do Qui-quadrado. [†]Idade em anos. *Evolução em meses.

6.2 ANÁLISE DOS ANTICORPOS ANGIOGÊNICOS

6.2.1 Análise do anticorpo WT1

Todas os espécimes exibiram marcação citoplasmática positiva para o WT1, tanto nas células mononucleares como quanto nas células gigantes (Figura 3). Houve diferença na percentagem de células mononucleares positivas e discreto aumento no escore DIC entre lesões agressivas (41,33% e 4,57, respectivamente) e não agressivas (38,40% e 4, respectivamente). Embora tenham sido observadas estas diferenças no percentual de expressão no escore DIC, os resultados não alcançaram significância estatística (Tabela 2). A expressão positiva percentual de células gigantes multinucleadas foi semelhante entre os grupos. O percentual de expressão e o escore DIC de células gigantes foram praticamente semelhantes entre lesões agressivas (2,6% e 2, respectivamente) e não agressivas (2,8% e 2, respectivamente) e de valor baixo devido a grande quantidade de células mononucleares positivas nos espécimes.

Figura 3. Expressão do anticorpo WT1.



Expressão positiva em células mononucleares (vide asteriscos) e em células gigantes (vide setas). (A) Lesão agressiva (B) Lesão não agressiva. Imunoistoquímica, ampliação da imagem 400x.

Tabela 2. Expressão de WT1 em células mononucleares (CMN) e células gigantes multinucleadas (CGM) representados em mediana (Q25-Q75)

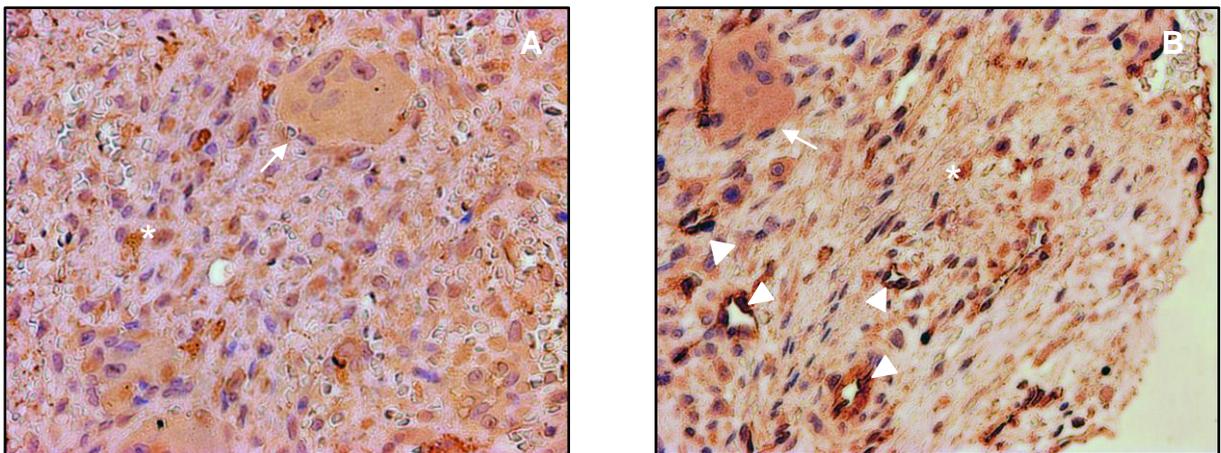
	Agressivas %(n=9)	Não agressivas %(n=29)	Valor de p ^a
Expressão em CMN (%)	41,33 (35,43-48,30)	38,40 (35,90-44,06)	0,381
Expressão em CGM (%)	2,6 (1,46-4,40)	2,8 (0,87-9,33)	0,891
Escore DIC em CMN	4,57 (3,28-6,14)	4 (2,36-4,71)	0,227
Escore DIC em CGM	2 (2-2,5)	2 (1-2)	0,188

^aTeste de Mann-Whitney

6.2.2 Análise do anticorpo CD31

O padrão de vascularização das LCCG foi avaliado pela análise da DMV obtida pela expressão citoplasmática positiva dos microvasos pelo CD31. Verificou-se expressão positiva dos microvasos, células mononucleares e células gigantes multinucleadas (Figura 4). Houve uma maior densidade de microvasos nas lesões agressivas (203,95 microvasos/mm²) quando comparadas as não agressivas (145,68 microvasos/mm²). Da mesma maneira, a expressão de CD31 também não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos investigados (p=0,175) (Tabela 3).

Figura 4. Expressão do anticorpo CD31.

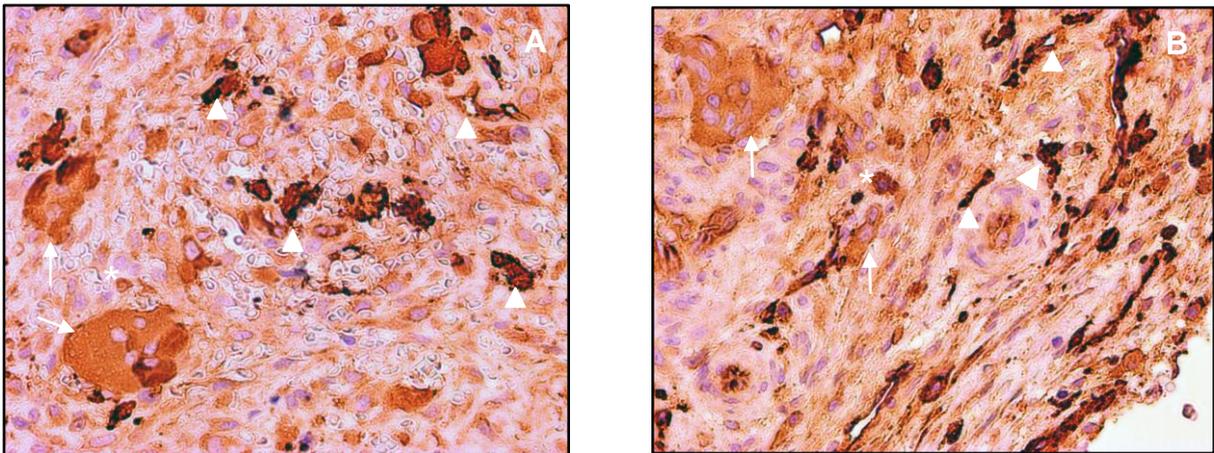


Expressão positiva em células mononucleadas (vide asterisco), células gigantes (vide seta) e em microvasos (vide ponta de seta). (A) Lesão agressiva. (B) Lesão não agressiva. Imunoistoquímica, ampliação da imagem 400x.

6.2.3 Análise do anticorpo CD105

A neoangiogênese foi quantificada nas LCCG por meio da DMV, a qual foi determinada pela expressão citoplasmática positiva do CD105 nos microvasos. Observamos ainda, marcação positiva de células mononucleares e células gigantes multinucleadas dispersas pelos espécimes (Figura 5). A forte expressão nas células endoteliais indica uma possível neoangiogênese proliferativa em atividade. Supreendentemente, embora tenha sido encontrada uma maior expressão de CD105 nas lesões agressivas (661,81 microvasos/mm²) quando comparadas as não agressivas (541,10 microvasos/mm²), os resultados também não alcançaram valores estatisticamente significantes ($p=0,272$) (Tabela 3).

Figura 5. Expressão do anticorpo CD105.



Expressão positiva em células mononucleares (vide asteriscos), células gigantes (vide setas) e vasos neoformados (vide ponta de seta). (A) Lesão agressiva (B) Lesão não agressiva. Imunoistoquímica, ampliação da imagem 400x

Tabela 3. Densidade microvascular (DMV) de CD31 e CD105 fornecidos em mediana (Q25-Q75)

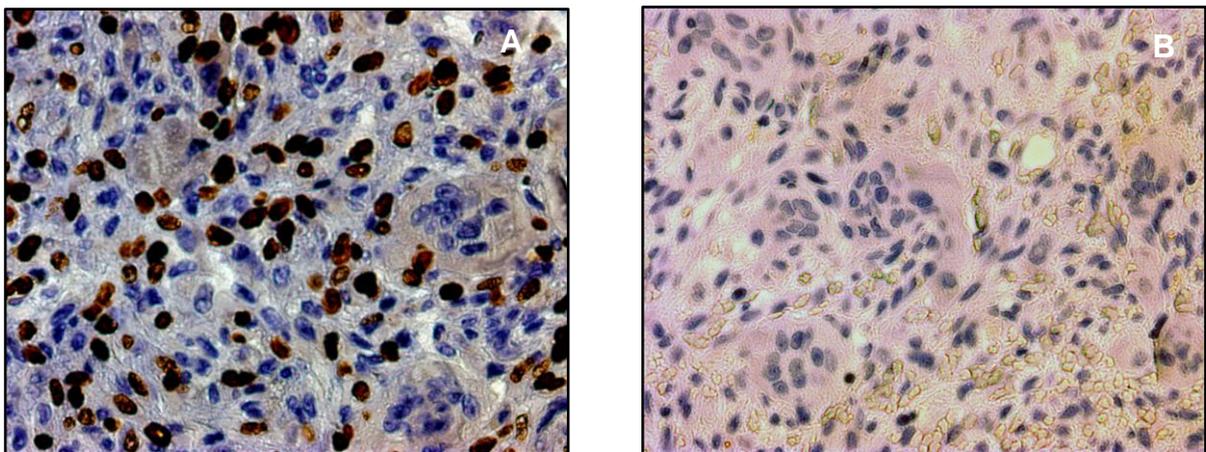
	Agressivas (n=9)	Não agressivas (n=29)	Valor de p ^a
CD31	203,95 (147,76-229,97)	145,68 (134,23-189,39)	0,175
CD105	661,81 (468,26-797,08)	541,10 (378,77-728,41)	0,272

^aTeste de Mann Whitney.

6.3 ANÁLISE DO ANTICORPO HISTONA H3.3 G34W

Nenhum espécime do total de LCCG investigadas neste estudo exibiu expressão positiva do anticorpo anti-Histona H3.3 G34W. Os controles positivos (TCG) utilizados para avaliar a efetividade do anticorpo H3.3 apresentaram expressão nuclear fortemente positiva, como pode ser observado pela figura 6A.

Figura 6. Expressão do anticorpo histona H3.3 G34W.



Expressão positiva em células mononucleares do TCG (A) Ausência de expressão na LCCG (B).
Imunoistoquímica, ampliação da imagem 400x.

Após realizado o teste de correlação de Spearman, não foi observada correlação entre as variáveis clínico-radiográficas e as expressões dos anticorpos angiogênicos.

7 DISCUSSÃO

As LCCG, classificadas como lesões relacionadas ao osso, acometem ossos gnáticos e constituem um grupo especial de lesões cuja etiopatogênese é controversa na literatura, principalmente com relação ao seu potencial neoplásico ou caráter reacional proliferativo (VERED *et al.*, 2006; REGEZI, 2004; PEACOCK *et al.*, 2012; ETOZ *et al.*, 2019). Neste estudo foi investigado o caráter vascular (angiogênese e padrão vascular) dessas lesões divididas em grupos de lesões agressivas e não agressivas, de acordo com os critérios propostos por Chuong *et al.* (1986). Além disso foi investigada a possibilidade de mutação gênica da histona H3.3, comumente observada nos TCG. Interessantemente, foi observado que os anticorpos WT1 e CD105, que são envolvidos no processo de angiogênese, apresentaram expressão positiva para ambos os grupos de lesões, entretanto, foi observado uma tendência de maior expressão do WT1 nas células mononucleares de lesões agressivas e do CD105 nos microvasos das lesões consideradas agressivas.

A expressão positiva do anticorpo WT1, tanto nas células mononucleares como nas células gigantes multinucleadas, pode fortalecer a patogênese dessa lesão com base na angiogênese de caráter neoplásico. O WT1 tem sido estudado e identificado em lesões vasculares proliferativas e tem um papel importante na diferenciação de malformações e neoplasias vasculares (AL DHAYBI *et al.*, 2010; NETTO *et al.*, 2012; GALFIONE *et al.*, 2014). Al Dhaybi *et al.* (2010) analisaram 65 tumores vasculares e 61 malformações vasculares e observaram que todos os tumores apresentavam expressão positiva para o WT1 e apenas 3 malformações vasculares foram positivas ao anticorpo WT1. Estes dados fortalecem o potencial da investigação dessa proteína para diferenciar lesões neoplásicas de malformações vasculares e por que não de lesões reacionais proliferativas como observado por Tokat *et al.* (2018) que avaliaram a expressão de WT1 em 20 amostras hiperplasia angiolímfóide com eosinofilia, das quais 19 foram positivas para WT1 possibilitando inferir que esta lesão na verdade é uma neoplasia vascular de natureza benigna. Esta proteína pode também estar relacionada a uma transição descontrolada de células epiteliais para mesenquimais e também possui um papel importante na angiogênese por meio da regulação do VEGF (NETTO *et al.*, 2012; GALFIONE *et al.*, 2014), a qual é expressa significativamente em células mononucleares conforme

identificado por Matos *et al.*, (2011). Até o presente momento, investigações envolvendo a expressão de WT1 em LCCG não são encontradas.

Nosso estudo evidenciou marcação positiva de WT1 em todas as amostras de LCCG, tanto em células mononucleares como em células gigantes multinucleadas, com maior expressão e escore DIC em células mononucleares de lesões agressivas. Estes dados pode ser representativos das atividades de angiogênese e proliferação vascular nessas lesões. Apesar da maior expressão em células mononucleares, a diferença de expressão entre os grupos não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Com referência a expressão do anticorpo CD31, que caracteriza o padrão vascular (vasos maduros), o nosso estudo evidenciou que as lesões agressivas e não agressivas apresentaram expressividade praticamente semelhante entre os grupos. Sadri *et al.* (2019) avaliaram a expressão do CD31 em LCCG e lesões periféricas de células gigantes, e encontraram expressão estatisticamente significativa do CD31 nas LCCG. Diferente do nosso estudo, os autores não verificaram a associação entre a expressão do CD31 e o comportamento biológico das lesões. No nosso estudo, foi observado uma tendência de maior expressão nas lesões mais agressivas, todavia sem alcançar significância estatística ($p > 0,05$). Este resultado está de acordo com os de Peacock *et al.* (2012) e El-Attar e Wahba (2016), que também não encontraram diferenças significativas entre as expressões de CD31 de lesões agressivas e não agressivas. Nossos resultados indicam que, apesar das LCCG agressivas possuírem uma maior densidade de vasos maduros, o comportamento biológico das LCCG não pode ser diferenciado quando consideramos apenas a expressão de CD31 e a densidade de vasos maduros presentes nas lesões.

Diferentemente do nosso estudo, Razavi e Yahyaabadi (2018), por meio da avaliação imunoistoquímica da expressão de CD31 e Ki-67 em 25 LCCG agressivas e 25 não agressivas, indicaram existir uma relação positiva entre estes marcadores com as características clínicas e histopatológicas das LCCG, e que o comportamento biológico pode ser previsto com base na expressão de microvasos e na proliferação de células fibroendoteliais. Os resultados mostraram uma diferença significativa na expressão de CD31 entre lesões agressivas e não agressivas ($p = 0,003$), apresentando maior expressão em lesões agressivas. O maior número da

amostra em relação ao nosso estudo pode ter contribuído para a diferença encontrada entre os grupos.

O CD105 é expresso em células endoteliais ativadas durante a angiogênese e é considerado um marcador endotelial mais preciso, quando comparado ao CD31, por caracterizar vasos neoformados. (CARDOSO *et al.*, 2009; ESHGHYAR *et al.*, 2011; ANDRADE-SANTOS *et al.*, 2011; DEL CARMEN GONZÁLEZ-GALVÁN *et al.*, 2016; NAIR *et al.*, 2016).

A literatura carece de estudos investigando o CD105 em LCCG. Há apenas o estudo de Falci *et al.*, 2014, que avaliaram a expressão de FASN, CD34, CD105 e D2-40 em lesões periféricas e centrais de células gigantes. Avaliaram 13 LCCG e observaram que 92% delas apresentavam vasos com expressão positiva para o CD105, a qual evidenciou uma atividade angiogênica e de remodelação tecidual nas LCCG. Diferente do nosso estudo, não foi objetivo de Falci *et al.* (2014), comparar a associação dos anticorpos com o comportamento biológico de lesões agressivas e não agressivas das LCCG. A grande maioria dos estudos envolvendo a investigação do CD105 são em tumores sólidos como os carcinomas de mama, adenocarcinomas de esôfago. No carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, o CD105 tem se mostrado um importante marcador prognóstico e preditor de malignidade (NAIR *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que, no nosso estudo, a expressão do CD105 foi mais elevada nas lesões agressivas. Esses dados indicam um potencial de neoangiogênese significativo para as LCCG e uma tendência de maior DMV para as lesões classificadas como agressivas, embora sem significância estatística.

Outro ponto investigado neste estudo foi a possibilidade de mutação gênica da histona H3.3 G34W nas LCCG. A literatura tem discutido a semelhança entre as LCCG e os TCG, tanto com referência ao comportamento biológico quanto ao padrão histopatológico. A grande questão é se não seriam lesões semelhantes e apenas com localizações anatômicas diferentes. Hoje é sabido com base em diversos trabalhos (GOMES *et al.*, 2014; PRESNEAU *et al.*, 2015; AMARY *et al.*, 2017) que a mutação da histona H3.3 é frequente nos casos de TCG e nossos resultados indicaram que do total de casos investigados de LCCG (n=38) nenhum exibiu expressão positiva para o anticorpo contra a histona H3.3 G34W e, portanto, não existe mutação da histona H3.3 nas LCCG, sejam elas agressivas ou não agressivas.

Gomes *et al.* (2014), avaliaram a presença de mutação da histona H3.3 em 9 amostras de LCCG por meio de sequenciamento genético direto e não encontraram a mutação em nenhuma LCCG. Da mesma maneira, Presneau *et al.* (2015) investigaram 5 casos de TCG por meio do mapeamento completo do genoma e pela análise genética direcionada para o rearranjo de H3F3A em 91 casos de TCG e 78 casos de LCCG. O mapeamento evidenciou mutação de H3F3A G34W nos 5 casos de TCG e a análise genética direcionada encontrou mutação do mesmo gene em 83 dos 91 tumores analisados. Em contrapartida, nenhuma mutação foi encontrada na análise genética dos 78 casos de LCCG. Já Amary *et al.* (2017) avaliaram a mutação por meio de imunohistoquímica em 235 casos de TCG e em 99 casos de LCCG e detectaram a alteração em 213 TCG (90,6%) e não observaram mutação em nenhum caso de LCCG.

Diante disto, nossos resultados indicam que a mutação da histona H3.3 não está presente e, portanto, não possui papel na patogênese das LCCG e na diferenciação entre lesões agressivas e não agressivas. Levando em consideração nosso estudo e outros como os realizados por Gomes *et al.* (2014), Presneau *et al.* (2015) e Amary *et al.* (2017), observamos que o anticorpo anti-Histona H3.3 G34W possui um papel importante para diagnóstico diferencial entre LCCG e TCG, por ser específico para o TCG e por utilizar um método mais acessível e de menor custo para o diagnóstico diferencial. Neste estudo foram utilizados dois casos de TCG como controles, os quais foram fortemente positivos para a mutação H3.3.

Com base em nossos resultados e na literatura pesquisada, pode ser inferido que as LCCG verdadeiras não apresentam a mutação da histona H3.3 e que casos positivos localizados nos ossos gnáticos podem ser considerados casos de TCG com localização não usual, ou seja, fora dos ossos longos conforme relatos de Sam *et al.* (2017) e Scotto di Carlo *et al.* (2018).

Embora este seja o primeiro estudo avaliando o padrão de angiogênese e vascularização das LCCG associado à investigação da mutação da histona H3.3 em lesões agressivas e não agressivas, consideramos como limitação do estudo o baixo número de amostras consideradas agressivas. A ampliação das amostras bem como o pareamento dos grupos considerando tempo de evolução, idade e localização sejam fatores que poderão interferir nos resultados.

Com base portanto, em nossos achados, consideramos que a realização de mais estudos utilizando marcadores endoteliais e fatores pró-angiogênicos (bFGF,

VEGF, TGF- α e TGF- β , TNF α , entre outros) são necessários, uma vez que as diferenças com base no comportamento biológico pode evidenciar alvos terapêuticos que possam reduzir a morbidade dos tratamentos cirúrgicos, diminuir as recidivas, reduzir custos e proporcionar melhor qualidade de vida aos indivíduos acometidos.

8 CONCLUSÕES

Em síntese, devido a tendência de maior expressão de CD105 quando em relação à expressão de CD31 em LCCG e a maior expressão desses marcadores em lesões mais agressivas, além da expressão alta de WT1 em ambos grupos de lesões, pode ser inferido que as LCCG são lesões de caráter vascular neoplásicas proliferativas.

A expressão negativa da mutação da histona H3.3 para as LCCG, indica que a mutação da histona H3.3 G34W não está relacionada a patogênese das LCCG e que é lesão distinta do TCG e que a eventual positividade da referida mutação em ossos gnáticos, na verdade caracterizaria a presença de TCG em localização não usual.

As expressões positivas elevadas de CD105 e CD31 pode indicar futuros alvos terapêuticos para tratamento com utilização de terapias antiangiogênicas possibilitando a redução de tratamentos cirúrgicos invasivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, B.; SHEAR, M. A histological comparison of the giant cells in the central giant cell granuloma of the jaws and the giant cell tumor of long bone. **Journal of Oral Pathology**, v. 3, n. 5, p. 217-223, 1974.

AHMED, A. A.; DUNLAP, C. Immunohistochemical detection of the receptor activator of nuclear factor Kappa B ligand and c-fos in giant cell granuloma. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 20, n.1, p. 47-50, 2016.

AL DHAYBI, R. *et al.* Differentiation of vascular tumors from vascular malformations by expression of Wilms tumor 1 gene: Evaluation of 126 cases. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 6, p. 1052-1057, 2010.

AMARAL, F. R. *et al.* WWOX expression in giant cell lesions of the jaws. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 116, n. 2, p. 210-213, 2013.

AMARY, M. F. *et al.* H3F3A (Histone 3.3) G34W Immunohistochemistry: A Reliable Marker Defining Benign and Malignant Giant Cell Tumor of Bone. **The American Journal of Surgical Pathology**, v.00, n.00, p. 1-10, 2017.

ANDRADE-SANTOS, P. P. *et al.* Immunohistochemical expression of nuclear factor kappaB, matrix metalloproteinase 9, and endoglin (CD105) in odontogenic keratocysts, dentigerous cysts, and radicular cysts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 112, n. 4, p. 476-483, 2011.

AUCLAIR, P. L. *et al.* A clinical and histomorphologic comparison of the central giant cell granuloma and the giant cell tumor. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 66, n. 2, p. 197-208, 1988.

BASNAKER, M.; SR, S.; BNVS, S. Expression of Endoglin (CD-105) and Microvessel Density in Oral Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma. **Journal of clinical and diagnostic research**, v. 8, n. 9, p. ZC91-ZC94, 2014.

BEHJATI, S. *et al.* Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. **Nature Genetics**, v. 45, n. 12, p. 1479-1482, 2013.

CARDOSO, S. V. *et al.* Assessment of angiogenesis by CD105 antigen in epithelial salivary neoplasms with diverse metastatic behavior. *BMC Cancer*, v. 9, n.1, p. 1-7, 2009.

CHRCANOVIC, B. R.; GOMES, C. C.; GOMEZ, R. S. Central giant cell lesion of the jaws: An updated analysis of 2270 cases reported in the literature. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 47, n. 5, p. 731-739, 2018.

CHUONG, R. *et al.* Central giant cell lesions of the jaws: A clinicopathologic study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 9, p. 708-713, 1986.

CLEVEN, H. G. A. *et al.* Mutation Analysis of H3F3A and H3F3B as a Diagnostic Tool for Giant Cell Tumor of Bone and Chondroblastoma. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 39, n. 11, p. 1576-1583, 2015.

COPRAY, S. *et al.* Epigenetic mechanisms facilitating oligodendrocyte development, maturation, and aging. **Glia**, v. 57, n. 15, p. 1579-1587, 2009.

DE LANGE, J.; VAN DEN AKKER, H. P.; VAN DEN BERG, H. Central giant cell granuloma of the jaw: a review of the literature with emphasis on therapy options. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 104, n. 5, p. 603-615, 2007.

DEL CARMEN GONZÁLEZ-GALVÁN, M. *et al.* Assessment of CD- 105 as an Angiogenic Modulator in Odontogenic Myxomas and Dental Follicles. **International Journal of Surgical Pathology**, v. 24, n. 4, p. 315-319, 2016.

DE YOUNG, B. R. *et al.* CD31 immunoreactivity in carcinomas and mesotheliomas. **American journal of clinical pathology**, v. 110, n. 3, p. 374-377, 1998.

DOLANMAZ, D. *et al.* Management of central giant cell granuloma of the jaws with intralesional steroid injection and review of the literature. **Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 20, n. 2, p. 203-209, 2016.

EL-ATTAR R. H. M.; WAHBA O.M. Expression of Ki67, CD31, CD68 and P53 in peripheral and central giant cell granuloma of the Jaws. **Archives in Cancer Research**, v. 4, n. 2:80, p. 1-8, 2016.

ELIAS, L. S. A. *et al.* Markers of bone remodeling in neoplastic and bone-related lesions. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**. v. 110, n. 5, p. 624-631, 2010.

ESHGHYAR, N. *et al.* Endoglin (CD105) Positive Microvessel Density and Its Relationship with Lymph Node Metastasis in Squamous Cell Carcinoma of the Tongue. **Archives of Iranian Medicine**, v. 14, n. 4, p. 276-281, 2011.

ETOZ, M.; ASANTOGROL, F.; AKYOL, R. Central giant cell granulomas of the jaws: retrospective radiographic analysis of 13 patients. **Oral Radiology**, [Epub ahead of print], 2019.

FALCI, S. G. M. *et al.* FASN expression, angiogenesis and lymphangiogenesis in central and peripheral giant cell lesions. **Journal of Applied Oral Science**, v. 22, n. 2, p. 131-137, 2014.

GADBAIL, A. R. *et al.* Tumor angiogenesis in keratocystic odontogenic tumor assessed by using CD-105 antigen. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 40, n. 3, p. 263-269, 2011.

GALFIONE, S. K. *et al.* Diagnostic utility of WT-1 cytoplasmic stain in variety of vascular lesions. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 5, p. 2536-2543, 2014.

GOMES, C. C. *et al.* The highly prevalent H3F3A mutation in giant cell tumours of bone is not shared by sporadic central giant cell lesion of the jaws. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 118, n. 5, p. 583-585, 2014.

GOMES, C. C. *et al.* TRPV4 and KRAS and FGFR1 gain-of-function mutations drive giant cell lesions of the jaw. **Nature Communications**, v. 9, n.1, p. 1-8, 2018.

HOSUR, M. B. *et al.* Clinicopathological profile of central giant cell granulomas: An institutional experience and study of immunohistochemistry expression of p63 in central giant cell granuloma. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 22, n. 2, p. 173-179, 2018.

JAFFE H. Giant-cell reparative granuloma, traumatic bone cyst, and fibrous (fibro-osseous) dysplasia of the jawbones. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 6, n.1, p. 159–175, 1953.

JERKINS, D. *et al.* Central Giant Cell Granuloma of the Mandible Requiring Multiple Treatment Modalities: A Case Report. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 74, n. 8, p. 1596-1607, 2016.

KABAN, L. B. *et al.* Antiangiogenic therapy of a recurrent giant cell tumor of the mandible with interferon alfa-2a. **Pediatrics**, v. 103, n. 6 Pt 1, p. 1145-9, 1999.

KABAN, L. B. *et al.* Antiangiogenic therapy with interferon alpha for giant cell lesions of the jaws. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 60, n. 10, p. 1103-1111, 2002.

KABAN, L. B. *et al.* Adjuvant Antiangiogenic Therapy for Giant Cell Tumors of the Jaws. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 65, n. 10, p. 2018-2024, 2007.

KALLAPPAGOUDAR, S. *et al.* Histone H3 mutations—a special role for H3.3 in tumorigenesis? **Chromosoma**, v. 124, n. 2, p. 177-189, 2015.

KANWAL, R.; GUPTA, K.; GUPTA, S. Cancer epigenetics: an introduction. **Methods in molecular biology**, v. 1238, p. 3-25, 2015.

KATURI, V. *et al.* WT1 regulates angiogenesis in Ewing Sarcoma. **Oncotarget**, v. 5, n. 9, p. 2436-2449, 2014.

KOUHSOLTANI, M.; MORADZADEH-KHIAVI, M.; TAHAMTAN, S. Evaluation of mast cell counts and microvessel density in reactive lesions of the oral cavity. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, v. 10, n. 4, p. 241-247, 2016.

KUJAN, O. *et al.* Immunohistochemical comparison of p53, Ki-67, CD68, vimentin, alpha-smooth muscle actin and alpha-1-antichymotry-psin in oral peripheral and central giant cell granuloma. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 16, n. 1, p. 20-24, 2015.

KUMAR, V. V. *et al.* Quantification and Correlation of Angiogenesis with Macrophages by Histomorphometric Method in Central and Peripheral Giant Cell Granuloma: An Immunohistochemical Analysis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 3, p. ZC01-ZC05, 2016.

LÜKE, J. *et al.* H3F3A mutation in giant cell tumour of the bone is detected by immunohistochemistry using a monoclonal antibody against the G34W mutated site of the histone H3.3 variant. **Histopathology**, v.71, n.1, p. 125-133, 2017.

MARIONI, G. *et al.* CD105 is a marker of tumour vasculature and a potential target for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 39, n. 5, p. 361-367, 2010.

MARTINS, A. F. *et al.* Glucocorticoids, calcitonin, and osteocalcin cannot differentiate between aggressive and nonaggressive central giant cell lesions of the jaws. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 120, n. 3, p. 386-395, 2015.

MATOS, F. R. *et al.* Immunoexpression of MMP-9, VEGF, and vWF in central and peripheral giant cell lesions of the jaws. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 40, n. 4, p. 338-344, 2011.

MCCARTY, G.; AWAD, O.; LOEB, D. M. WT1 protein directly regulates expression of vascular endothelial growth factor and is a mediator of tumor response to hypoxia. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 51, p. 43634-43643, 2011.

NAIDU, A. *et al.* Management of Central Giant Cell Granuloma With Subcutaneous Denosumab Therapy. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 12, p. 2469-2484, 2014.

NAIR, S. *et al.* Immunohistochemical Expression of CD105 and TGF-beta1 in Oral Squamous Cell Carcinoma and Adjacent Apparently Normal Oral Mucosa and its Correlation With Clinicopathologic Features. **Applied Immunohistochemistry & molecular morphology**, v. 24, n. 1, p. 35-41, 2016.

NETTO, A. C. *et al.* Wilms tumor 1 protein is not expressed in oral lymphangiomas. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 6, p. 707-710, 2012.

NOHR, E. *et al.* Diagnostic value of histone 3 mutations in osteoclast-rich bone tumors. **Human Pathology**, v. 68, p. 119-127, 2017.

O'CONNELL, J. E. *et al.* Aggressive giant cell lesion of the jaws: a review of management options and report of a mandibular lesion treated with denosumab. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 120, n. 5, p. e191-e198, 2015.

PEACOCK, Z. S. Controversies in Oral and Maxillofacial Pathology. **Oral and Maxillofacial Surgery of Clin North America**, v. 29, n. 4, p. 475-486, 2017.

PEACOCK, Z. S.; JORDAN, R. C. K.; SCHMIDT, B. L. Giant Cell Lesions of the Jaws: Does the Level of Vascularity and Angiogenesis correlate With Behavior? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 70, n. 8, p. 1860-1866, 2012.

PRESNEAU, N. *et al.* Diagnostic value of H3F3A mutations in giant cell tumour of bone compared to osteoclast-rich mimics. **The Journal of Pathology: Clinical Research**, v. 1, n. 2, p. 113-123, 2015.

PUSZTASZERI, M. P.; SEELENTAG, W.; BOSMAN, F. T. Immunohistochemical Expression of Endothelial Markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in Normal Human Tissues. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 54, n. 4, p. 385-395, 2006.

RAZAVI, S. M.; YAHYAABADI, R. Comparative Study of Correlation between Angiogenesis Markers (CD31) and Ki67 Marker with Behavior of Aggressive and Nonaggressive Central Giant Cell Granuloma with Immunohistochemistry Technique. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 19, n. 8, p. 2279-2283, 2018.

REGEZI, J. A. Comments on the pathogenesis and medical treatment of central giant cell granulomas. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 1, p. 116-118, 2004.

REGEZI, J. A. Odontogenic Cysts, Odontogenic Tumors, Fibroosseous, and Giant Cell Lesions of the Jaws. **Modern Pathology**, v. 15, n. 3, p. 331-341, 2002.

RESNICK, C. M. *et al.* A Comparison of Phenotypic, Clinical, and Radiographic Characteristics. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 68, n. 1, p. 130-137, 2010.

RIGHI, A. *et al.* Histone 3.3 mutations in giant cell tumor and giant cell-rich sarcomas of bone. **Human Pathology**, v. 68, p. 128-135, 2017.

ROBERSON, J. B.; CROCKER, J. B.; SCHILLER, T. Diagnosis and treatment of central giant cell granuloma. **The Journal of the American Dental Association**, v. 128, n. 1, p. 81-88, 1997.

ROSERBERG, A. E. Ossos, articulações e tumores de tecidos moles. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (Orgs.). **Robbins & Cotran. Patologia – Bases patológicas das doenças**. 7^a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. cap. 26, p. 1331–1385.

SADRI, D. *et al.* Expression of CD34 and CD31 in Central and Peripheral Giant Cell Granulomas. **Journal of Dentistry (Shiraz, Iran)**, v. 20, n. 1, p. 10-15, 2019.

SAM, J. E. *et al.* Giant cell tumor of temporomandibular joint masquerading as temporomandibular joint pain dysfunction syndrome: a rare case report. **Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 43, n. 2, p. 134-137, 2017.

SCOTTO DI CARLO, F.. *et al.* The identification of H3F3A mutation in giant cell tumour of the clivus and the histological diagnostic algorithm of other clival lesions permit the differential diagnosis in this location. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2018.

SCHREUDER W. H. *et al.* Adjuvant Antiangiogenic Treatment for Aggressive Giant Cell Lesions of the Jaw: A 20-Year Experience at Massachusetts General Hospital. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 75, n. 1, p. 105-118, 2017.

SUN, Z. J. *et al.* Central giant cell granuloma of the jaws: clinical and radiological evaluation of 22 cases. **Skeletal Radiology**, v. 38, n. 9, p. 903-909, 2009.

TIMÁR, J. *et al.* WT1 expression in angiogenic tumours of the skin. **Histopathology**, v. 47, n. 1, p. 67-73, 2005.

TOBÓN-ARROYAVE, S. I. *et al.* Immunohistochemical expression of RANK, GR α and CTR in central giant cell granuloma of the jaws. **Oral Oncology**. v. 41, n. 5, p. 480-488, 2005.

TOKAT, F. *et al.* Immunoreactivity of Wils tumor 1 (WT1) as an additional evidence supporting hemangiomatous rather than inflammatory origin in the etiopathogenesis of angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia. **Dermatology practical & conceptual**, v. 8, n. 1, p. 28-32, 2018.

TRIANAFILLIDOU, K. *et al.* Central Giant Cell Granuloma of the Jaws: A Clinical Study of 17 Cases and a Review of the Literature. **The Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology**, v. 120, n. 3, p. 167-174, 2011.

VALENTINE, J. C.; NELSON, B. L. Central giant cell lesion. **Head and Neck Pathology**, v. 5, n. 4, p. 385-388, 2011.

VERED, M.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. Giant cell granuloma of the jawbones – a proliferative vascular lesion? Immunohistochemical study with vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 35, n. 10, p. 613-619, 2006.

YAMAMOTO, H. *et al.* Diagnostic utility of histone H3.3 G34W, G34R and G34V mutant-specific antibodies for giant cell tumors of bone. **Human Pathology**, v.73, p. 41-50, 2018.

WAKULICH, C. *et al.* Immunohistochemical localization of growth factors fibroblast growth factor-1 and fibroblast growth factor-2 and receptors fibroblast growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-3 in normal oral epithelium, epithelial dysplasias, and squamous cell carcinoma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v.93, p.573-579, 2002.

ANEXO

Extrato via Plataforma Brasil do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão de marcadores angiogênicos e mutacional em Lesão Central de Células Gigantes: Correlação clínico-patológica

Pesquisador: Elismauro Francisco de Mendonça

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 04921218.8.0000.5083

Instituição Proponente: Universidade Federal de Goiás - UFG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.179.567

Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa: Expressão de marcadores angiogênicos e mutacional em Lesão Central de Células Gigantes: Correlação clínico-patológica.

Pesquisador Responsável: Elismauro Francisco de Mendonça. **Participantes:** SÉRGIO ALVES DE OLIVEIRA FILHO e ALLISSON FILIPE LOPES MARTINS.

CAAE: 04921218.8.0000.5083

Trata-se de um projeto de mestrado a ser desenvolvido no Laboratório de Imunoistoquímica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO/UFG). A casuística consistirá de 38 lesões centrais de células gigantes (LCCG) diagnosticadas previamente por meio de exames clínico-radiográfico e anatomopatológico. Os blocos contendo as lesões a serem submetidas a imunoistoquímica serão obtidos do arquivo de blocos do Laboratório de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia. Após a pesquisa, os blocos contendo as amostras serão devolvidos ao seu local de origem. Os dados clinicopatológicos e demográficos serão coletados dos registros em prontuários e dos exames de imagens, após autorização de acesso ao arquivo, para classificar as lesões em agressivas e não-agressivas. Os dados coletados serão armazenados pelo pesquisador responsável e somente a equipe envolvida no estudo terá acesso aos mesmos. Os casos selecionados serão numerados, não identificando os participantes da pesquisa. Para todas as amostras selecionadas serão levantadas as imagens radiográficas que permitiram o diagnóstico radiográfico das LCCG e será investigado a extensão e tamanho da lesão, o envolvimento dentário,

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação - Agência UFG de Inovação, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2
Bairro: Campus Samambaia, UFG **CEP:** 74.690-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.179.567

presença de reabsorção radicular, presença de reabsorção óssea, rompimento de cortical, septação ou não no interior da lesão, presença ou ausência de lâmina dura periodontal. Estes dados, associados aos dados clínicos, contribuirão para a classificação das lesões em agressivas e não agressivas.

O projeto será desenvolvido com recursos próprios da Faculdade de Odontologia/UFG (material permanente) e também verba de pesquisas anteriores já realizadas pela instituição (material de consumo). Estima-se um valor de R\$ 45.318,80 para o desenvolvimento do projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar e comparar o perfil angiogênico e vascular em LCCG agressivas e não-agressivas, e verificar a presença de mutação do gene H3F3A em ambos os grupos.

Objetivo Secundário:

Investigar a expressão, por meio da imunistoquímica, dos marcadores de vascularização CD105, CD31 e WT-1 em lesões agressivas e não agressivas;

Investigar a expressão, por meio da imunistoquímica, de H3.3 mutada em lesões agressivas e não agressivas; Correlacionar a expressão de marcadores angiogênicos mutacional com o comportamento biológico das lesões.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

Os pesquisadores relatam que não há riscos aos indivíduos participantes da pesquisa, uma vez que se trata de um estudo longitudinal retrospectivo. Eles garantem o sigilo ao realizar a pesquisa nos blocos de parafina e nos prontuários.

Benefícios

Diante do conhecimento existente sobre LCCG, algumas lacunas importantes podem ser evidenciadas como a falta de concordância dos estudos sobre a caracterização do aspecto vascular na LCCG, a pouca evidência sobre a correlação entre marcadores angiogênicos e o comportamento biológico da lesão, além da existência ou não de mutação genética na LCCG ainda pouco explorada na literatura. A resposta a estas lacunas ainda não esclarecidas poderá contribuir para ampliar o conhecimento da LCCG. Contribuir para a indicação de terapias menos agressivas por meio de anti-angiogênicos, diminuindo a morbidade do tratamento realizado. Este trabalho será o primeiro a avaliar a expressão de WT1, CD31 e CD105 conjuntamente na LCCG e a correlacionar com a agressividade das lesões, além de verificar a presença ou não de mutação da proteína

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação - Agência UFG de Inovação, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2
Bairro: Campus Samambaia, UFG **CEP:** 74.690-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.179.567

histona H3.3 em LCCG agressivas e não agressivas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e factível.

Todos os documentos estão apresentados de forma adequada.

No projeto de pesquisa e nas informações básicas da pesquisa pede-se a dispensa do TCLE, uma vez que serão utilizadas amostras emblocadas e não haverá coleta de material biológico. Ademais, é garantido o sigilo nas pesquisas dos prontuários e, estes, serão identificados por números e somente a equipe da presente pesquisa terá o acesso às informações.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

PB INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO 1278903.pdf; PROJETO DE MESTRADO SERGIO ALVES.docx; TERMO DE COMPROMISSO.jpeg; TERMO DE ANUENCIA.jpeg e FOLHA DE ROSTO.pdf. O protocolo de pesquisa está devidamente apresentado pelos documentos elencados.

A folha de rosto está devidamente assinada e com o carimbo da diretora da Faculdade de Odontologia da UFG e consta 38 participantes.

O termo de compromisso está assinado pelo coordenador e participantes da pesquisa; e devidamente elaborado.

Quanto ao termo de anuência está assinado pela diretora da Faculdade de Odontologia/UFG e com a ciência de que a coleta de dados acontecerá de fevereiro a junho de 2019.

No arquivo do projeto consta o início da parte prática (seleção dos blocos e demais atividades práticas) em abril de 2019 e término em novembro de 2019.

Nas informações básicas do projeto consta que a qualificação ocorrerá em julho de 2019.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considera-se a presente pesquisa aprovada, s.m.j. deste comitê de ética em pesquisa. No entanto, o pesquisador deverá colocar uma cópia dos resultados dos exames nos prontuários de cada paciente. Deverá também incluir uma declaração no relatório final, desta pesquisa de que os resultados foram anexados à cada prontuário dos participantes da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS n. 466/12 e

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação - Agência UFG de Inovação, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2
Bairro: Campus Samambaia, UFG **CEP:** 74.690-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.179.567

Resolução CNS n. 510/16. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1278903.pdf	19/12/2018 17:19:19		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DE_MESTRADO_SERGIO_ALVES.docx	19/12/2018 17:18:00	Elismauro Francisco de Mendonça	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_COMPROMISSO.jpeg	19/12/2018 17:16:39	Elismauro Francisco de Mendonça	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TERMO_DE_ANUENCIA.jpeg	19/12/2018 17:14:56	Elismauro Francisco de Mendonça	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	19/12/2018 17:13:42	Elismauro Francisco de Mendonça	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GOIANIA, 01 de Março de 2019

Assinado por:
João Batista de Souza
(Coordenador(a))

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação - Agência UFG de Inovação, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2
Bairro: Campus Samambaia, UFG **CEP:** 74.690-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com