

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

ALLISSON FILIPE LOPES MARTINS

**EXPRESSÃO DE OSTEOCALCINA E DE RECEPTORES DA
CALCITONINA E GLICOCORTICOIDE EM LESÃO CENTRAL DE
CÉLULAS GIGANTES DO COMPLEXO MAXILO-MANDIBULAR**

Goiânia

2015

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) 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), 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

Autor (a):	Allisson Filipe Lopes Martins		
E-mail:	allissonfilipe@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	Sigla:	CNPq
País:	Brasil	UF:	DF
CNPJ:	33.654.831/0001-36		
Título:	Expressão de Osteocalcina e de Receptores da Calcitonina e Glicocorticoide em Lesão Central De Células Gigantes do Complexo Maxilo-Mandibular		
Palavras-chave:	granuloma central de células gigantes, receptores de glicocorticoide, receptores de calcitonina, osteocalcina		
Título em outra língua:	Expression of Osteocalcin, glucocorticoid and calcitonin receptors in Central Giant Cell Lesions of the Jaws		
Palavras-chave em outra língua:	Central Giant Cell Lesion, Glucocorticoid receptor, Calcitonin receptor, osteocalcin		
Área de concentração:	Clínica Odontológica		
Data defesa:	27/03/2015		
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-Graduação em Odontologia		
Orientador (a):	Elismauro Francisco de Mendonça		
E-mail:	elismaur@ufg.br		

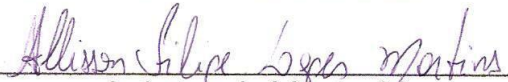
*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

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

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.


 Assinatura do (a) autor (a)

Data: 26 / 04 / 2015

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.

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

ALLISSON FILIPE LOPES MARTINS

**EXPRESSÃO DE OSTEOCALCINA E DE RECEPTORES DA CALCITONINA E
GLICOCORTICOIDE EM LESÃO CENTRAL DE CÉLULAS GIGANTES DO
COMPLEXO MAXILO-MANDIBULAR**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, para Exame de Defesa, como requisito 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

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Filipe Lopes Martins, Allisson
Expressão de Osteocalcina e de Receptores da Calcitonina e
Glicocorticoide em Lesão Central De Células Gigantes do Complexo
Maxilo-Mandibular [manuscrito] / Allisson Filipe Lopes Martins. - 2015.
CLV, 155 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade
de Odontologia (FO) , Programa de Pós-Graduação em Odontologia,
Goiânia, 2015.

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

1. Granuloma Central de Células Gigantes. 2. Receptores de
Glicocorticoide. 3. Receptores de Calcitonina. 4. Osteocalcina. I.
Francisco de Mendonça, Elismauro, orient. II. Título.

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

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

Aluno: Allisson Filipe Lopes Martins

Orientador: Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça

MEMBROS:

Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça

Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka

Prof^a. Dr^a Maria Alves Garcia Santos Silva

Suplentes:

Prof^a. Dr^a Nádia do Lago Costa

Prof. Dr^a Ana Helena Gonçalves de Alencar

Data: 27/03/2015

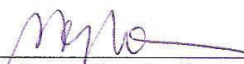
Allisson Filipe Lopes Martins

Expressão de osteocalcina e de receptores da calcitonina e glicocorticoide em lesão central de células gigantes no complexo maxilo-mandibular

Dissertação defendida e aprovada em 27,03,2015, pela Banca Examinadora constituída por:



Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça
Presidente da Banca



Prof.ª Dr.ª Maria Alves Garcia Santos Silva
Membro da Banca



Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka
Membro da Banca

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades fornecidas e principalmente pelas pessoas que Ele colocou em meu caminho, as quais contribuíram imensamente para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À minha família, meus pais Josué Martins e Sirene Lopes pelo apoio durante todos esses anos, pelas oportunidades oferecidas e pelo carinho, amor e compreensão com que aceitam as minhas decisões. Ao meu irmão André Luiz L. Martins pelos momentos de companheirismo e por compreender minha ausência, desejo-o ainda sorte em sua trajetória como Mestre.

À Carolina de Fátima Reis por estar sempre ao meu lado, em todos os momentos, por ser minha confidente, minha amiga e agradeço ainda pela cumplicidade. Quando decidimos trilhar caminhos parecidos foi uma imensa alegria saber que enfrentaríamos os desafios juntos. Agradeço ainda pelo seu amor.

Ao meu orientador Elismauro Francisco de Mendonça pela paciência, pelos ensinamentos e pela oportunidade. Agradeço pela sua simplicidade e disponibilidade que me atendia sempre que o procurava. Agradeço por sua vontade de me ver crescer profissionalmente. Agradeço ainda a confiança depositada em mim. Deus o abençoe ainda mais. Às Professoras Aline Carvalho Batista e Nádia do Lago Costa que tanto contribuíram para o meu crescimento e em especial pelos primeiros ensinamentos dentro do ambiente científico e laboratorial. Agradeço por terem despertado em mim a vontade de me tornar um pesquisador.

Aos companheiros de trabalho Diego Antonio Arantes, Andréia Gonçalves, Marília Moraes, Angélica Oton-Leite e Inara Rege com quem tive oportunidade de conviver antes do ingresso no Mestrado. Agradeço pelo convívio com pessoas extremamente competentes e fiéis. Além disso, agradeço pelos compartilhamentos dentro do laboratório, mas acima de tudo pelos compartilhamentos da vida que me faz os chamar de amigos.

Agradeço ao novo companheiro de trabalho Paulo Otávio Souza que durante esse tempo tive a oportunidade de confirmar sua amizade e dedicação. Agradeço também pelo apoio prestado para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço aos meus amigos Murilo Prado, Rodrigo Andrade, Túlio Nogueira, Mayara Mundim, Guilliano Serpa e Hianne Torres. A amizade de vocês foi a grande descoberta do curso e a cultivarei para sempre.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Agradeço à **Universidade Federal de Goiás** e a **Faculdade de Odontologia** que tornaram possível a realização da pesquisa e do curso de pós-graduação.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq) pela concessão da bolsa de Mestrado e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás** (FAPEG) pelo apoio financeiro à realização da pesquisa.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FO-UFG** por tornar possível uma pós-graduação de qualidade, pelo conhecimento adquirido através de disciplinas e atividades extracurriculares, e pelo apoio em eventos científicos.

Ao **Hospital Araújo Jorge/Associação de Combate ao Câncer em Goiás** (HAJ/ACCG) por ceder material necessário para o desenvolvimento de parte da pesquisa.

SUMÁRIO

QUADROS E FIGURAS	13
TABELAS	15
SÍMBOLO, SIGLAS E ABREVIATURAS	17
RESUMO	19
ABSTRACT	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 JUSTIFICATIVA	25
3 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	27
3.1 A LESÃO CENTRAL DE CÉLULAS GIGANTES	27
3.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E RADIOGRÁFICAS	32
3.3 ETIOLOGIA DA LCCG	35
3.4 MICROAMBIENTE DE LESÕES AGRESSIVAS X NÃO AGRESSIVAS	39
3.5 TRATAMENTO	42
3.5.1 Glicocorticoide, calcitonina e seus receptores	61
3.6 REABSORÇÃO ÓSSEA NA LCCG	65
4 OBJETIVOS	69
4.1 OBJETIVO GERAL	69
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	69
5 HIPÓTESE	71
6 MATERIAL E MÉTODOS	73
6.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA	73
6.2 TÉCNICA DA HEMATOXILINA E EOSINA	77
6.3 TÉCNICA DA IMUNOHISTOQUÍMICA	77
6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	79
7 PUBLICAÇÃO	81
8 CONCLUSÕES	111
9 REFERÊNCIAS	113
10 ANEXOS	127

QUADROS E FIGURAS

Quadro 1. Critérios para classificação da LCCG	33
Quadro 2. Principais estudos comparativos de proteínas presentes no microambiente da Lesão Central de Células Gigantes.	40
Quadro 3. Resumo dos principais artigos sobre tratamento da LCCG com injeção intralesional de corticosteroide	46
Quadro 4. Resumo dos principais artigos sobre tratamento da LCCG com calcitonina	52
Quadro 5. Resumo dos principais artigos sobre tratamento da LCCG com interferon	57
Quadro 6. Resumo dos principais artigos sobre tratamentos combinados e outras modalidades de tratamentos não cirúrgicos da LCCG	60
Quadro 7. Resumo dos casos estudados	75
Quadro 8. Anticorpos utilizados para estudo imunohistoquímico	78
Figura 1. Esquema da hipótese patogênica da Lesão Central de Células Gigantes	36
Figura 2. Esquema das vias de ativação de genes pelo receptor de glicocorticoide- α	62
Figura 3. Esquema da reabsorção óssea em tecido ósseo normal	66
 Figuras da Publicação	
Figure 1. Immunohistochemistry staining for glucocorticoid-receptor	107
Figure 2. Immunohistochemistry staining for calcitonin-receptor	107
Figure 3. Immunohistochemistry for osteocalcin	108
Figure 4. Correlation graphs	109

TABELAS**Tabelas da Publicação**

Table 1. Clinical features of the cases studied	104
Table 2. GR, CTR and OC expression and SID score in mononuclear cells. Results are expressed as median (maximum and minimum values)	105
Table 3. GR, CTR and OC expression and SID score in multinucleated giant cell. Results are expressed as median (maximum and minimum values)	106

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

bFGF	Fator de crescimento de fibroblasto básico
COA	Cisto ósseo aneurismático
CGCL	Central Giant Cell Lesion (Lesão Central de Células Gigantes)
CGM	Células Gigantes Multinucleadas
CMO	Células Mononucleares
COX-2	Ciclooxigenase 2
CTR	Calcitonin receptor (receptor de calcitonina)
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
FO/UFG	Faculdade de Odontologia/Universidade Federal de Goiás
GCTB	Giant Cell Tumor of Bone (Tumor Ósseo de Células Gigantes)
GR	Glucocorticoid receptor (receptor de glicocorticoide)
HE	Hematoxylin and eosin (Hematoxilina e eosina)
IDS	Intensidade da distribuição de marcação
LCCG	Lesão Central de Células Gigantes
LPCG	Lesão Periférica de Células Gigantes
MGC	Multinucleated Giant Cell (Célula Gigante Multinucleada)
MMP	Metaloproteinase de matriz
MOC	Mononuclear cells (Células mononucleares)
OC	Osteocalcina/Osteocalcin
OPG	Osteoprotegerina
RAMPS	Proteínas Modificadoras da atividade dos receptores
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B
RCT	Receptor de Calcitonina
RGC	Receptor de Glicocorticoide
SID	Staining intensity distribution
TCG	Tumor de Células Gigantes
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

RESUMO

A Lesão Central de Células Gigantes (LCCG) é uma lesão intraóssea que pode ser classificada em não agressiva e agressiva. Devido aos defeitos estéticos e funcionais do tratamento cirúrgico da LCCG, terapias medicamentosas tem sido relatadas, como injeções de glicocorticoide e calcitonina. Há na literatura estudos que suportam o uso desses medicamentos através da investigação da presença de receptores de glicocorticoides (RGC) e de calcitonina (RCT) em LCCG. No entanto não existe consenso se todas as LCCG expressam esses receptores e se existe alguma diferença entre lesões agressivas e não agressivas. Além disso, não existem estudos sobre a avaliação do potencial de formação óssea através da Osteocalcina (OC) em lesões agressivas e não agressivas. O propósito deste estudo foi avaliar comparativamente, por meio de imunohistoquímica, a expressão de RGC e RCT e da OC em LCCG não agressivas (n= 20) e agressivas (n= 11) e a correlação entre a expressão da OC e desses receptores nos dois grupos de lesões estudados. O número de mitoses nas células mononucleares e o número de células gigantes multinucleadas também foram investigados, utilizando técnica histoquímica (hematoxilina e eosina). Nossos resultados mostram que todos os casos analisados expressam o RGC e RCT e que não existe diferença na expressão do RGC, RCT ou do número de mitoses entre lesões não agressivas e agressivas. A expressão de OC em células mononucleares foi rara e maior em lesões não agressivas, no entanto, sem diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$). Houve correlação entre a expressão do RCT em células mononucleares e células gigantes multinucleadas ($r = 0,45$; $p < 0,01$). Considerando as diferentes variantes foi verificada correlação do RCT entre o componente mononuclear e as células gigantes multinucleadas nas lesões não agressivas ($r = 0,66$; $p < 0,01$) e entre a expressão de OC e RCT em células gigantes multinucleadas ($r = 0,718$; $p = 0,01$). Houve maior número de células gigantes em lesões agressivas ($p = 0,01$). Os resultados indicam que todos os casos expressam RGC e RCT e que não há diferenças entre lesões agressivas e não agressivas de LCCG quanto à expressão desses receptores, fortalecendo a recomendação o tratamento da LCCG com o uso de glicocorticoide e calcitonina. Lesões agressivas apresentam maior número de CGM. As células da LCCG expressam o RGC e RCT e esse achado pode fornecer bases biológicas para o tratamento com injeções intralesionais de glicocorticoides e o uso de calcitonina, seja em lesões não agressivas ou agressivas. Adicionalmente, foram identificadas células expressando OC, que podem estar relacionadas ao reparo ósseo, acredita-se que essa linhagem celular também pode se tornar um alvo terapêutico.

Palavras-chave: Granuloma Central de Células Gigantes, Receptores de Glicocorticoide, Receptores de Calcitonina, Osteocalcina

ABSTRACT

The Central Giant Cell Lesion (CGCL) is an intraosseous lesion that can be classified into non aggressive and aggressive. Due to the aesthetic and functional defects of surgical treatment of CGCL, therapies with drugs have been reported, such as glucocorticoid injections and calcitonin. The studies reported in the literature support the use of these drugs through the investigation of the presence of glucocorticoid receptors (RGC) and calcitonin (RCT) in CGCL; however there is no consensus if all lesions express these receptors and if there is any difference between non aggressive and aggressive lesion. In addition, there are no studies that evaluated the bone formation potential through the investigation of Osteocalcin (OC) in aggressive and non-aggressive lesions. The aim of this study was to compare, using immunohistochemistry, the GR and CTR and osteocalcin protein (OC) expression in non aggressive (n = 20) and aggressive (n = 11) CGCL, and the correlation between the OC expression and these receptors determined in both groups of lesions. The number of mononuclear cells in mitosis (MOC), and the number of multinucleated giant cells (MGC) were also investigated using immunohistochemical techniques (hematoxylin and eosin). Our results show that all the cases express the GR and CTR and that there is no difference in the expression of these receptors or the number of mitosis between non aggressive and aggressive lesions. The OC expression was rare and higher in non aggressive lesions, however, not statistically significant ($p > 0.05$). There was a correlation between the CTR expression in MOC and MGC ($r = 0.45$; $p < 0.01$). Considering the different variants of CGCL, there was a correlation between CTR expression in MOC and MGC in non aggressive lesions ($r = 0.66$; $p < 0.01$) and between the CTR and OC expression in MGC ($r = 0.718$; $p = 0.01$). There was a higher number of MGC in aggressive lesions ($p = 0.01$). The results indicate that all cases express GR and CTR and that there are no differences between non aggressive and aggressive CGCL lesions of these receptors expression, these results strengthens CGCL treatment with glucocorticoids and calcitonin. Aggressive lesions have a higher number of MGC. The CGCL express glucocorticoid and calcitonin receptors and this finding give biological basis to the CGCL treatment with intralesional glucocorticoid and calcitonin either in non aggressive and aggressive cases. It was also identified osteocalcin positive cells, that may be related to bone repair, it is believed that these cells may also serve as a therapeutic target.

Keywords: Central Giant Cell Lesion, Glucocorticoid receptor, Calcitonin receptor, Osteocalcin

1 INTRODUÇÃO

A Lesão Central de Células Gigantes (LCCG) é uma lesão intraóssea benigna e de natureza desconhecida (NOGUEIRA et al., 2012a; NICOLAI et al., 2010; VERED; BUNCHER; DAYAN, 2006). A maioria das lesões ocorre na mandíbula com predileção para o sexo feminino e média de idade entre 20 e 30 anos (RAWASHDEH; BATAINEH; AL KHATEEB, 2006; KRUSE-LÖSLER, 2006; VERED; BUNCHER; DAYAN, 2006; NICOLAI et al., 2010). Por se apresentarem como lesões radiolúcidas que podem ser uni ou multiloculares, as características radiográficas não são específicas para o diagnóstico de LCCG (KRUSE-LÖSLER, 2006).

A LCCG é uma lesão rica em células fusiformes, por vezes arredondadas ou ovais com a notável presença de células gigantes multinucleadas (CHUONG et al., 1986; REGEZI, 2002; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; VERED; BUNCHER; DAYAN, 2006). O diagnóstico microscópico diferencial deve ser estabelecido através da investigação clínica e radiológica incluindo Tumor Marrom do Hiperparatireoidismo, Querubismo e Cisto Ósseo Aneurismático (REGEZI, 2002).

Chuong et al. (1986) foram os primeiros a sugerir a divisão da LCCG em lesões não agressivas e agressivas. As lesões consideradas não agressivas apresentam pouco ou nenhum sintoma e são caracterizadas por crescimento lento, ausência de perfuração da cortical óssea e de reabsorção das raízes dos dentes envolvidos e baixa taxa de recorrência. Por outro lado, lesões agressivas são caracterizadas pela presença de dor, crescimento rápido, perfuração da cortical e reabsorção de raízes, bem como alta taxa de recorrência.

O principal tratamento para a LCCG é o cirúrgico, sendo que a curetagem seguida por ostectomia periférica e a enucleação são os procedimentos mais comuns (NICOLAI et al., 2010; KRUSE-LÖSLER et al., 2006). No intuito de reduzir defeitos estéticos e funcionais causados pela terapia cirúrgica, tem sido descritos na literatura tratamentos medicamentosos para a LCCG, tais como injeções intralesionais de glicocorticoides e uso de calcitonina (spray ou via subcutânea) (DE LANGE; VAN DEN AKKER, 2005; BORGES et al., 2008; ALLON; ANAVI; CALDERON, 2009).

Estudos prévios investigaram a presença dos receptores de glicocorticoide (RGC) e da calcitonina (RCT) em LCCG a fim de fortalecer o uso desses medicamentos (TOBÓN-ARROYAVE et al., 2005; VERED; BUNCHER; DAYAN;

2006; NOGUEIRA et al., 2012a). Tobón-Arroyave et al. (2005) foram os primeiros a investigar a presença desses receptores e verificaram que lesões agressivas apresentavam maior expressão de RCT, no entanto, Nogueira et al. (2012a) não encontraram diferenças quanto a expressão do RGC ou RCT.

Adicionalmente Vered, Buncher e Dayan (2006) verificaram que todos os casos de LCCG estudados expressavam RGC, mas algumas lesões não expressavam o RCT. Ao contrário Nogueira et al. (2012a) verificaram que nem todos os casos expressavam o RGC, mas todas as lesões estudadas expressavam o RCT. Esses estudos fortalecem o uso desses agente terapêuticos, no entanto, não esclarecem se todas as LCCG expressam esses receptores ou se existe diferenças na expressão do RGC e RCT em lesões agressivas e não agressivas.

Tem-se relatado o uso de proteínas que atuam na reabsorção óssea como tratamento para a LCCG (DE LANGE; VAN DEN AKKER; VAN DEN BERG, 2007a; SCHREUDER et al., 2014) e, nesse sentido, o conhecimento do processo biológico de reabsorção e neoformação óssea torna-se importante para o entendimento da patogênese, para suportar a terapia com esses agentes e compreender o processo de reparo ósseo na LCCG. Elias et al. (2010) sugerem que o comportamento osteolítico da LCCG está associado à expressão aumentada das proteínas RANK e RANKL. Essas proteínas estão envolvidas na reabsorção óssea fisiológica e hipotetiza-se que a ligação RANK-RANKL é responsável pela ativação das células gigantes multinucleadas e consequente reabsorção óssea (LIU; YU; LI, 2003; TOBON-ARROYAVE et al., 2005).

Apesar do processo de reabsorção óssea na LCCG ser bem compreendido, a literatura carece de dados sobre células osteogênicas e o potencial de formação óssea das células da LCCG. O nível de atividade dos osteoblastos e formação óssea pode ser mensurado através da avaliação da proteína osteocalcina, a qual consiste em uma proteína produzida por osteoblastos ativos e uma de suas funções tem relação com a ligação do cálcio à matriz óssea. Tem-se descrito que a LCCG expressa pouco ou não expressa essa proteína (PARK et al., 1995; ELIAS et al. 2010), no entanto estudos comparativos que avaliaram a expressão da osteocalcina em lesões não agressivas e agressivas ainda não foram realizados.

2 JUSTIFICATIVA

Regezi e Pogrel (2003) afirmaram que o desenvolvimento racional de uma terapêutica para LCCG deve-se basear em estudos laboratoriais e clínicos, com o intuito de obter resultados favoráveis a partir do estudo de genes e proteínas envolvidas na patogênese da lesão identificando possíveis alvos terapêuticos.

Estudos prévios sobre o RGC e RCT em LCCG fortalecem o uso de glicocorticoide e calcitonina como agentes terapêuticos, no entanto não existe consenso se todas as lesões expressam esses receptores, ou ainda se existe diferenças na expressão do RGC e RCT em lesões agressivas e não agressivas (TOBÓN-ARROYAVE et al., 2005; VERED; BUNCHER; DAYAN, 2006; NOGUEIRA et al., 2012a). A melhor caracterização desses receptores auxiliará a dirimir essas dúvidas presentes na literatura e também na compreensão da incerteza do resultado do tratamento da LCCG com esses medicamentos (DE LANGE et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2010; SCHUTZ et al., 2010; DA SILVA et al., 2012; RUBIO-CORREA et al., 2012; DA SILVA SAMPIERI et al., 2013; SCHREUDER et al., 2014).

Tem sido descrita, ainda, a utilização de medicamentos que podem atuar no processo de remodelação óssea como tratamento da LCCG (SCHREUDER et al., 2014). O processo de reabsorção óssea tem sido estudado, no entanto há necessidade de se investigar o potencial de formação óssea e reparo nessa lesão através do estudo da expressão de OC. Verificar, ainda, se há diferenças entre a expressão dessa proteína nas lesões agressivas e não agressivas e sua correlação com os RGC e RCT.

Este será o primeiro trabalho que avaliará comparativamente a OC em LCCG agressiva e não agressiva e a possível correlação dessa com a expressão dos RGC e RCT.

Os resultados dessa investigação contribuirão para o melhor entendimento da patogênese da LCCG e colaborará para escolha do tratamento com base no comportamento biológico de lesões mais agressivas e menos agressivas.

3 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

3.1 A LESÃO CENTRAL DE CÉLULAS GIGANTES

A LCCG é uma lesão intraóssea benigna de natureza idiopática (DE LANGE; VAN DEN AKKER; VAN DEN BERG, 2007a; ALLON; ANAVI; CALDERON, 2009; NICOLAI et al., 2010). Foi descrita pela primeira vez por Jaffe (1953) como Granuloma Reparativo de Células Gigantes, com o intuito de diferenciá-la do Tumor de Células Gigantes (TCG) o qual ocorre normalmente em ossos longos não gnáticos. Para o autor, as lesões representavam um processo inflamatório granulomatoso em resposta a focos de hemorragia e não apresentavam componente tumoral como ocorre no TCG.

O termo Granuloma Reparativo de Células Gigantes entrou em desuso e o termo Granuloma Central de Células Gigantes ainda é utilizado devido à tradição. Para a Organização Mundial de Saúde o termo adequado é Lesão Central de Células Gigantes (BARNES et al., 2005) e caracteriza-se por apresentar, microscopicamente, um estroma rico em células mononucleares (CMO) fusiformes, por vezes arredondadas ou ovais (predominantemente fibroblastos) e células gigantes multinucleadas (CGM) permeando esse estroma, além de áreas de hemorragia e, ocasionalmente, osso imaturo (CHUONG et al., 1986; REGEZI, 2002; BARNES et al., 2005; KRUSE-LOSLENER et al., 2006; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006).

De Lange, Vand den Akker e Van den Berg (2007a) descreveram os achados microscópicos da LCCG como uma lesão altamente celular com estroma fibroblástico, com células em formas fusocelular e alto índice mitótico, além de apresentar alta densidade vascular. As células gigantes se destacam, mas não são necessariamente abundantes. Normalmente as CGM são distribuídas irregularmente e localizadas em maior número permeando áreas hemorrágicas.

Essas características não são exclusivas da LCCG e o diagnóstico microscópico diferencial deve ser estabelecido através da investigação clínica e radiológica incluindo Tumor Marrom do Hiperparatireoidismo, Querubismo e Cisto Ósseo Aneurismático (REGEZI, 2002; TOSCO et al., 2009).

Querubismo é uma desordem fibroóssea rara definida pelo aparecimento de lesões radiolúcidas, multiloculares, expansivas e simétricas na mandíbula e/ou

maxila que normalmente se inicia na infância que tendem a regredir após a puberdade (KOUGARS; NIAMTU; SVIRSKY, 1992; MENG; YU; YU, 2005; LIMA; ALMEIDA; CABRAL, 2010; PAPADAKI et al., 2012). O diagnóstico dessa condição é baseado na idade do paciente, histórico familiar, exame clínico, achados radiográficos e análises bioquímicas e moleculares (PAPADAKI et al., 2012; TSODOULOS et al., 2014). Os achados radiográficos não são conclusivos, no entanto, quando observadas áreas radiolúcidas bilaterais em mandíbula, normalmente no ângulo e ramo, deve-se levado em consideração a suspeita de querubismo (MENG et al., 2005; PEÑARROCHA et al., 2005; LIMA; ALMEIDA; CABRAL, 2010; PAPADAKI et al., 2012).

O Querubismo é uma desordem autossômica dominante, em que mutações no gene *SH3BP2* levam ao aparecimento das lesões. É importante ressaltar que em alguns casos não foram identificadas mutações no gene relatado, esse fato pode estar relacionado a uma heterogeneidade genética (PAPADAKI et al., 2012). O tratamento depende da severidade das lesões. Nas formas mais leves, o manejo dos casos consiste na observação longitudinal, através de exames clínicos e controle radiográfico (PAPADAKI et al., 2012). Intervenções cirúrgicas são indicadas após a puberdade e quando há comprometimento estético e funcional (tais como obstrução nasal, proptose e deformidades faciais). Defeitos estéticos e funcionais graves (deslocamento da órbita ou perda de visão) justificam intervenções cirúrgicas antes de se cessar a puberdade (PAPADAKI et al., 2012).

A má oclusão dentária é uma das principais preocupações ocasionadas pelo querubismo (PEÑARROCHA et al., 2005; LIMA; ALMEIDA; CABRAL, 2010; PAPADAKI et al., 2012; TSODOULOS et al., 2014). O uso de mantenedores de espaço e exposição cirúrgica de dentes impactados são procedimentos recomendados para minimizar esse problema (PAPADAKI et al., 2012).

O cisto ósseo aneurismático (COA) é uma lesão óssea osteolítica que possui sangue preenchendo cavidades de tamanhos variados separadas por septos de tecido conjuntivo que contém tecido osteóide e células gigantes do tipo osteoclasto (ARORA, 2014). Podem ser lesões primárias ou podem estar associados a outras lesões já existentes, recebendo a denominação de COA secundário. As lesões mais comumente associados ao COA secundários são: fibroma ossificante, fibroma cemento-ossificante, LCCG e displasia fibrosa (ARORA, 2014; SUN et al., 2009a).

O COA é mais comum na mandíbula de pacientes abaixo dos vinte anos de idade. O sinal clínico mais comum é a tumefação do local atingido, que pode ser assintomática ou sintomática. Radiograficamente, a maioria das lesões se apresentam multiloculares com bordas bem definidas, podendo causar expansão e reabsorção das corticais ósseas, além de deslocamento dentário e reabsorção radicular, no entanto as características radiográficas não são patognomônicas (MOTAMEDI et al., 2008; SUN et al., 2010; HENRIQUES et al., 2012).

A etiologia do COA, assim como da LCCG, é controversa. Três teorias discutem a possível origem do COA: 1 – origem traumática resultando em hemorragia supraparosteal ou intramedular com processo de reparo falho. 2 – status hemodinâmico alterado que causa congestão do leito vascular, causando erosão do osso com conseqüente expansão. 3 – fenômeno secundário a uma lesão primária. Além disso, há estudos evidenciando anormalidades cromossômicas que podem levar ao aparecimento do COA (MOTAMEDI et al., 2008).

Uma translocação t (16; 17) (q22; p13) tem sido associada à patogênese de lesões primárias do COA (OLIVIERA et al., 2004a; OLIVEIRA et al., 2004b; ARORA, 2014; AGARAM, 2014). Tem-se levantado a hipótese de que o COA pode ser uma variante da LCCG (PERROTTI et al., 2004; MOTAMEDI et al., 2008). No entanto, Vergel De Dios et al (1992) afirmam que o estroma do COA é mais fibroso que o da LCCG, além disso a presença de espaços vasculares grandes apontam para o diagnóstico de COA. Adicionalmente Agaram et al. (2014) demonstraram que rearranjos no gene USP6 (localizado em um dos cromossomos alterados no COA) estão presentes em casos de COA, mas esse gene não se encontra alterado em casos de LCCG.

O Tumor Marrom do Hiperparatireoidismo (TMH) é uma lesão osteolítica reacional causada pelo hiperparatireoidismo primário ou secundário (TRANTAFILLIDOU et al., 2006; ETEMADI et al., 2009). Os pacientes desenvolvem o TMH devido a processos patológicos que resultam na hipersecreção do paratormônio ou do peptídeo relacionado ao paratormônio.

O hiperparatireoidismo primário é caracterizado pela hipersecreção do paratormônio, causado, na maioria dos casos, por adenomas na glândula paratireoide, testes laboratoriais bioquímicos indicam hipercalcemia e hipofosfatemia nessas lesões. Os casos de hiperparatireoidismo secundário são causados principalmente por falência renal crônica e, ao contrário do caso anterior,

apresentam hipocalcemia e hiperfosfatemia (TRIANFILLIDOU et al., 2006; ETEMADI et al., 2009).

Lesões intraorais se apresentam como tumefações endurecidas e sintomáticas a palpação (GUNEY et al., 2001). Os aspectos radiográficos refletem lesões osteolíticas uni ou multiloculares bem definidas que podem causar expansão das corticais ósseas (TRIANFILLIDOU et al., 2006). Ocasionalmente lesões de TMH podem ocasionar reabsorção radicular e da lâmina dura (DANIELS, 2004; TRIANFILLIDOU et al., 2006).

O tratamento consiste em resolver o quadro de hiperparatireoidismo, pois o TMH tende a regredir após o tratamento do desequilíbrio hormonal (TRIANFILLIDOU et al., 2006; GANGIDI; DYER; CUNLIFFE, 2012). No entanto, o tratamento medicamentoso ou cirúrgico também pode ser indicado, sendo que terapias cirúrgicas são essenciais em casos que o TMH causa comprometimentos funcionais para os pacientes (TRIANFILLIDOU et al., 2006). Já a terapia com medicamentos é indicada quando a cirurgia é contraindicada ou em casos de hipercalcemias leves (níveis séricos menores que 11mg/dL) (TRIANFILLIDOU et al., 2006).

No intuito de verificar a real diferença entre as lesões de células gigantes dos ossos gnáticos e de outros ossos do esqueleto, análises comparativas tem sido realizadas. Jaffe (1953) afirmou que as lesões de células gigantes são entidades diferentes a partir de observações clínicas e histopatológicas. De acordo com o autor, o Granuloma Reparativo de Células Gigantes dos Ossos Gnáticos ocorre preferencialmente em indivíduos entre 10 e 25 anos de idade, ao contrário do TCG que raramente acontece abaixo dos 20 anos. Na microscopia, o TCG apresenta um tecido lesional com maior número de células gigantes e essas estão distribuídas mais uniformemente em um estroma rico em células fusiformes ou poliédricas. Além disso, o TCG apresenta um comportamento clínico mais agressivo, alta taxa de recidiva e possibilidade de metástase para os pulmões.

Abrams e Shear (1974) estudando as CGM de ambas as lesões verificaram que na LCCG as CGM têm menor número de núcleos e são menores do que as encontradas no TCG, suportando a ideia de que a LCCG e o TCG são lesões distintas. Os autores verificaram ainda que as lesões podem apresentar características microscópicas sobrepostas, o que as torna indistinguíveis. Os resultados sugerem que é possível que LCCG ocorram em ossos não gnáticos, bem

como o TCG ocorra em ossos gnáticos. Além disso, os autores sugerem a multiplicação do comprimento pela largura das CGM como um método de diagnóstico para diferenciar o TCG e a LCCG. Se o resultado da multiplicação for maior que 1500 μ m favorece o diagnóstico de TCG, se menor favorece o de LCCG.

Auclair et al. (1988) analisaram comparativamente aspectos clínicos e histológicos de 42 TCG e 49 LCCG. Os resultados indicaram que a média de idade de aparecimento da lesão é de 21 para LCCG e 25 para TCG, leve predileção para o gênero feminino em ambas as lesões e não encontraram diferença no tamanho médio das células gigantes entre as lesões. Além disso, foi observada no TCG áreas de necrose, distribuição mais uniforme das CGM, maior número de focos com células inflamatórias e proeminente componente celular no estroma, quando comparado com a LCCG. Os autores sugerem que as lesões apresentam características similares que podem caracterizá-las tanto como de ossos longos quanto de ossos gnáticos. Mas estas características microscópicas indicam fases evolutivas de uma mesma entidade, influenciada pela idade e pelo sítio anatômico comprometido.

Em estudo imunohistoquímico sobre a expressão das proteínas do ciclo celular (ciclina D1 e B1 e Ki-67) em amostras de LCCG e TCG, realizado por Kauzman et al (2003 e 2004), foi verificado que os padrões de expressão dessas proteínas foram semelhantes para os dois tipos de lesões, fortalecendo a teoria que essas lesões são iguais e as diferenças estariam relacionadas aos sítios anatômicos de ocorrência. Aragão et al. (2007) avaliaram comparativamente a expressão das proteínas CD-68, fibronectina e tenascina entre LCCG e TCG e os resultados indicaram não existir diferenças entre os dois tipos de lesões.

Resnick et al. (2010) compararam o fenótipo, características clínicas e radiográficas de lesões dos ossos do esqueleto Axial/Apendicular e ossos maxilofaciais. Foram investigadas 45 lesões que ocorreram em ossos do complexo maxilofacial e 48 lesões que acometeram ossos do esqueleto axial/appendicular. Os autores verificaram que lesões de ossos maxilofaciais ocorrem em indivíduos mais jovens, são comumente assintomáticas, menores e a abordagem terapêutica é diferente. Apesar disso, acreditam que as Lesões de Células Gigantes independente do sítio anatômico são similares e representam a mesma entidade.

Kashyap et al. (2014) avaliaram comparativamente características histológicas em 20 casos de LCCG e 5 de TCG. Os resultados da investigação

mostraram que as CGM em TCG apresentam maior área de superfície fracionada ocupada pela célula e também um maior índice de tamanho relativo do que em LCCG. Os autores acreditam que as lesões são distintas e não um processo contínuo da mesma doença.

Gomes et al. (2014) investigando mutações no gene *H3F3A* em LCCG verificaram que esse gene não se apresenta mutado nos casos analisados, ao contrário do que acontece em TCG, onde se verifica mutações no gene *H3F3A*. Esse achado suporta a teoria de que as lesões são entidades diferentes e que o referido gene pode auxiliar no diagnóstico diferencial dessas lesões de células gigantes.

3.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E RADIOGRÁFICAS

A LCCG é uma condição rara e, de acordo com um estudo de base populacional feito na Holanda, estima-se que tenha uma incidência de 1,05 novos casos para homens a cada milhão e de 1,25 novos casos para mulheres a cada milhão. No geral a incidência é de 1,1 novo caso a cada um milhão de pessoas, estudos de bases populacionais mundiais ou do Brasil ainda não foram realizados (DE LANGE; VAN DEN AKKER; KLIP, 2004). Estima-se que a LCCG corresponde a 0,15% dos espécimes enviados para análise histológica (REDDY et al., 2012).

Chuong et al. (1986), estudando características clínicas e radiográficas sugeriram a classificação da LCCG em agressivas e não agressivas. As lesões não agressivas eram caracterizadas por ausência ou mínima sintomatologia, crescimento lento, ausência de rompimento ou reabsorção das corticais ósseas e baixa taxa de recorrência, enquanto as lesões agressivas apresentavam dor, crescimento rápido, perfuração da cortical, reabsorção radicular e alta taxa de recorrência (Quadro 1). Essa classificação tem sido seguida por diversos outros autores, em vários estudos, com mínimas modificações (CARLOS; SEDANO, 2002; POGREL, 2003; TOBON-ARROYAVE et al., 2005; KRUSE-LOSLER et al., 2006; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006; DE LANGE; VAN DEN AKKER; VAN DEN BERG, 2007a; BORGES et al., 2008; ALLON; ANAVI; CALDERON, 2009; NOGUEIRA et al., 2012a; REDDY et al., 2012).

Quadro 1. Critérios para classificação da LCCG em não agressiva e agressiva de acordo com Chuong et al. (1986).

	NÃO AGRESSIVA	AGRESSIVA
Sintomatologia	Ausente ou mínima	Presente
Crescimento	Lento	Rápido (grandes proporções)
Corticais ósseas	Preservadas	Rompidas
Relação dentária	-	Reabsorção Deslocamento
Taxa de recidiva (curetagem)	Baixa	Alta

Estudos demonstram que a LCCG é mais comum em pacientes do sexo feminino, na faixa etária entre 20-30 anos e a mandíbula é o sítio mais acometido. De Lange e van den Akker (2005), em estudo sobre características clínicas e radiográficas de 83 casos de LCCG, verificaram que o sexo mais acometido foi o feminino, sendo que a média de idade dos pacientes foi de 30,8 anos, sendo que 67,4% dos casos ocorreu em mandíbula. Kruse-Lösler et al. (2006) também observaram que as LCCG apresentam predileção pela mandíbula de pacientes do sexo feminino.

Em uma análise retrospectiva realizada por Farrier et al. (2005) foram analisados nove casos de LCCG. Os autores encontraram uma predileção pelo sexo masculino, sendo a média de idade de 27 anos. A predileção pelo sexo masculino que foi encontrada é discordante da literatura e pode ser devido ao número limitado de casos analisados. Sun et al. (2009), avaliando 22 casos de LCCG, verificaram que a maioria ocorreu em mulheres, com média de idade de 31,7 anos e a mandíbula foi o sítio mais acometido. Finalmente, Triantafillidou et al. (2011) e Reddy et al. (2012) também encontraram predileção pelo sexo feminino, sendo a

mandíbula mais acometida que a maxila e a média de idade dos casos estudados era abaixo dos 30 anos.

Kruse-Lösler et al. (2006) afirmaram que as LCCG se distribuíram igualmente entre a porção posterior e anterior quando na mandíbula e quando na maxila, a região anterior foi mais acometida. Reddy et al. (2012) verificaram que a região posterior da mandíbula é mais acometida e na maxila as LCCG acometem mais a região anterior.

O sinal clínico mais comumente descrito para a LCCG é o aumento de volume no local acometido, podendo causar assimetrias visíveis (DE LANGE; VAN DEN AKKER, 2005; FARRIER et al., 2006; SUN et al., 2009; TRIANTAFILLIDOU et al., 2011). Essas lesões podem ainda estar relacionadas com alguma desordem genética, tais como a Neurofibromatose tipo I, Querubismo e a Neurofibromatose tipo I com fenótipo *Noonan-like* (DE LANGE; VAN DEN AKKER, 2005; TRIANTAFILLIDOU et al., 2011). A terapia cirúrgica é a mais comum e casos de recorrência ocorreram mais em lesões que apresentavam sinais e/ou sintomas de agressividade (DE LANGE; VAN DEN AKKER, 2005; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; SUN et al., 2009; TRIANTAFILLIDOU et al., 2011). Sun et al. (2009) encontraram um período médio de para a recorrência de 2,5 anos após o tratamento inicial.

As características radiográficas apresentadas em casos de LCCG não são exclusivas dessa lesão e, portanto não são específicas para o diagnóstico. De lesões apicais pequenas a lesões multiloculares extensas comprometendo grande parte da maxila ou da mandíbula são achados observados em estudos descritos na literatura (DE LANGE; VAN DEN AKKER, 2005; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; FARRIER et al., 2006; SUN et al., 2009). As LCCG podem se apresentar como defeitos radiolúcidos uni ou multiloculares e, na maioria das vezes, com bordas bem definidas (DE LANGE; VAN DEN AKKER, 2005; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; FARRIER et al., 2006; TRIANTAFILLIDOU et al., 2011). Reabsorção radicular, deslocamento dentário, além de expansão da cortical óssea e destruição dessa cortical também são características radiográficas descritas na literatura (DE LANGE; VAN DEN AKKER, 2005; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; FARRIER et al., 2006; TRIANTAFILLIDOU et al., 2011).

3.3 ETIOLOGIA DA LCCG

A etiologia da doença ainda permanece desconhecida e de difícil elucidação. Jaffe (1953) inicialmente afirmou que a lesão consistia em um processo reacional que se curaria espontaneamente; corroborando com essa teoria, casos de cura espontânea são descritos na literatura (BERTI et al., 2009; VIEIRA et al., 2014).

Berti et al. (2009) descreveram o caso de uma paciente de 53 anos com um nódulo avermelhado de aproximadamente 1,5 cm no rebordo alveolar do lado direito da mandíbula. Os achados radiográficos da região revelavam uma imagem radiolúcida bem definida de aproximadamente seis centímetros. Uma biópsia foi realizada e o diagnóstico microscópico de LCCG estabelecido, exames bioquímicos do sangue foram solicitados para realizar o diagnóstico diferencial de Tumor Marrom do Hiperparatireoidismo. A paciente não realizou o exame e 19 meses após foram observadas áreas sugestivas de reparo ósseo em imagens radiográficas solicitadas. Uma biópsia do local da lesão foi realizada e o laudo foi compatível com osso normal. A paciente foi acompanhada durante três anos e não houve relatos de recorrência.

Vieira et al. (2014) relataram um caso de paciente masculino, 12 anos de idade, com lesão radiolúcida de limites precisos acometendo a região anterior da mandíbula. No exame intraoral foi evidenciada cicatriz de biópsia prévia cujo diagnóstico havia sido de displasia óssea fibrosa. Nova biópsia foi realizada e o diagnóstico microscópico foi de LCCG e excluída a possibilidade de Tumor Marrom do Hiperparatireoidismo pelos exames bioquímicos do sangue. Após o diagnóstico o paciente não optou por tratamento cirúrgico e após 8 meses foi verificada por meio de imagens radiográficas a remissão espontânea da lesão sem a realização de qualquer tipo de terapia.

Vários autores tem sugerido que algumas dessas lesões podem ter origem neoplásica e que a distinção das formas reacionais e neoplásicas é difícil (WHITAKER; WALDRON, 1993; REGEZI; POGREL, 2004; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006; NOGUEIRA et al., 2012a).

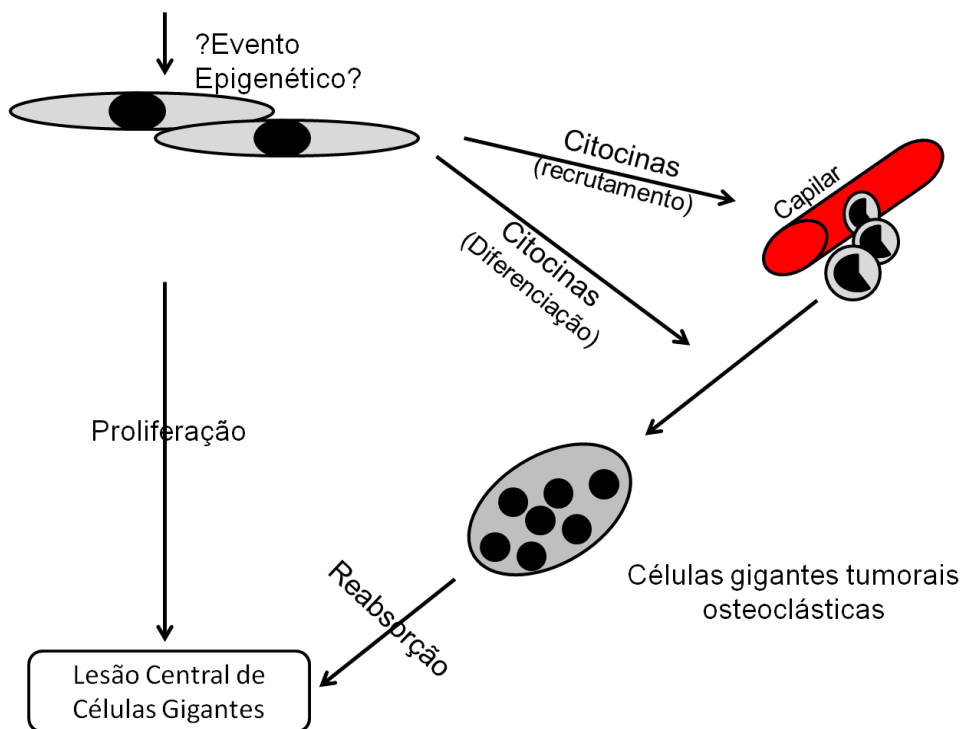
Regezi e Pogrel (2004) sugerem que a origem tumoral se desenvolve a partir de uma lesão reacional (reparativa) por meio de um evento epigenético que ocorre no nível das células mesenquimais fusiformes, resultando em falha no controle do

ciclo celular e na expressão de proteínas capazes de recrutar monócitos e promover sua diferenciação em osteoclastos (Figura 1).

Tendo em vista que a LCCG pode estar presente em pacientes com doenças de origem genética, tais como o Querubismo, a Neurofibromatose tipo I e Síndrome de Noonan (DE LANGE; VAN DEN AKKER; VAN DEN BERG, 2007a), tem-se investigado a relação dessa doença com as alterações genéticas evidentes nessas patologias a fim de se estabelecer a etiologia da doença.

Carinci et al. (2005), estudando o perfil genético da LCCG, por meio da técnica de microarranjos de DNA, identificaram que vários genes apresentavam alta (genes envolvidos na regulação do ciclo celular e em sinais de transdução) ou baixa expressão (genes que regulam a apoptose). Os autores identificaram vários marcadores que podem auxiliar na identificação do comportamento biológico da lesão e possíveis alvos terapêuticos, no entanto, sugerem que um maior número de casos seja avaliado para gerar melhor conhecimento sobre o perfil genético da LCCG.

Figura 1. Esquema da hipótese patogênica da Lesão Central de Células Gigantes.



Fonte: adaptado de Regezi e Pogrel, 2004.

Buresh et al. (1999) relataram uma anomalia citogenética em um caso de Lesão de Células Gigantes acometendo osso longo. Johnson et al. (2007) também

identificaram uma anomalia cromossômica em um caso de TCG acometendo osso da mão. Já em estudo de seis casos de LCCG dos ossos gnáticos utilizando hibridização genômica comparativa, nenhuma alteração cromossômica foi encontrada (KRUSE-LÖSLER et al., 2006).

Manor et al. (2013), em estudo citogenético de uma LCCG acometendo a mandíbula, observaram a presença de aberrações cromossômicas em algumas células da lesão. Os autores acreditam que a LCCG não possui uma aberração citogenética específica já que outros estudos trazem alterações cromossômicas diferentes (BURESH et al., 1999; CARINCI et al., 2005; JOHANSSON et al., 2007).

Nogueira et al. (2013), visando entender melhor os eventos genéticos envolvidos na LCCG, investigaram o gene *CCND1* e a proteína p16^{INK4a}, ambos importantes no controle do ciclo celular e no desenvolvimento de tumores. Os autores verificaram que algumas lesões apresentam alta expressão desse gene, que pode estar relacionado à patogênese da doença e consequente formação de células gigantes multinucleadas. Os autores sugeriram, ainda, que a LCCG pode ser uma lesão de natureza neoplásica. Os resultados do estudo demonstram ainda que as lesões não agressivas apresentam maior expressão da proteína p16^{INK4a}, uma proteína com função de inibir que a célula entre em divisão, e que o gene *CCND1* encontra-se amplificado em células mononucleares, o que pode corresponder a uma alteração epigenética que leva a mudanças no ciclo celular e desenvolvimento da LCCG.

Acredita-se que o gene *SH3BP2* possa ter um papel na etiologia da LCCG (DE LANGE et al., 2007b; TEIXEIRA et al., 2011). Esse gene apresenta-se alterado no Querubismo, uma síndrome autossômica dominante que afeta a remodelação óssea na mandíbula e maxila (DE LANGE et al., 2007b; IDOWU et al., 2008; CARVALHO et al., 2009). Alguns autores sugeriram que devido a características histológicas semelhantes ao Querubismo, as LCCGs podem compartilhar a mesma alteração genética responsável pelo desenvolvimento dessa anormalidade genética (DE LANGE et al., 2007b; CARVALHO et al., 2009).

De Lange et al. (2007b) coletaram sangue de 4 pacientes com LCCG e analisaram o DNA para o exon 9 do gene *SH3BP2* (local da mutação no querubismo); nenhuma mutação nesse gene foi encontrada. Idowu et al. (2008) investigaram mutações somáticas do gene *SH3BP2* em 15 amostras de LCCG. As regiões do exon 10 e 9 foram investigadas em células mononucleares e nenhuma

mutação foi encontrada nos casos analisados. Adicionalmente, Carvalho et al. (2009), estudando o DNA de todo o gene *SH3BP2* das lesões e do sangue periférico de 4 pacientes com LCCG e um com Querubismo, observaram que em um caso de LCCG e o caso de Querubismo apresentavam mutações gênicas. Concluíram, no entanto, que um melhor sequenciamento do gene deve ser realizado para complementar o estudo de mecanismos moleculares associados com essas lesões.

Teixeira et al. (2011) analisaram o sangue periférico de 30 indivíduos e 14 casos incluídos em parafina de LCCG. Não foram encontradas alterações nos exons estudados (exons 3, 9 e 11). Uma alteração no exon 4 foi identificada no sangue de nove pacientes, no entanto, essa alteração não foi significativa na patogênese da LCCG. Os autores sugerem que são necessárias mais investigações para possíveis mutações no gene *SH3BP2* investigando exons não estudados e, também, considerando outras proteínas que podem interagir com o gene.

Amaral et al. (2010), estudando o NFATc1 e TNF- α (genes ativados pelo *SH3BP2* capazes de induzir osteoclastogênese, inflamação e perda óssea) em LCCG, Lesão Periférica de Células Gigantes (LPCG) e Querubismo, verificaram uma maior expressão de NFATc1 e uma menor expressão de TNF- α em LCCG comparada ao controle (sangue de indivíduos saudáveis). Além disso, uma maior transcrição do NFATc1 foi observada no núcleo de CGM quando comparada a CMO em LCCG. Os resultados sugerem que o desenvolvimento de lesões com células gigantes pode ser devido à alta expressão do NFAT no núcleo das CGM.

Ainda tentando elucidar a patogênese das lesões de células gigantes, Amaral et al. (2011) investigaram a expressão de genes relacionados à apoptose em LCCG e LPCG. Ambas as lesões apresentaram índice de apoptose maior do que a mucosa oral normal. A LPCG apresentou maior índice do que a LCCG e as células gigantes parecem ser as principais responsáveis por essa atividade apoptótica. Os autores sugerem que a diferença da atividade de apoptose entre a LCCG e a LPCG pode estar associada com o comportamento clínico diferente das lesões.

Nogueira et al. (2012b) estudaram o papel da Ciclooxigenase-2 (COX-2) na etiopatogenia da LCCG. A COX-2 é uma molécula inflamatória que tem relação com a carcinogênese. Os autores verificaram que somente algumas lesões expressavam essa molécula. A COX-2, quando expressa, limitava-se à periferia da lesão e estava associada à ulceração vista clinicamente. Portanto, os resultados demonstram que a COX-2 não participa da etiopatogenia da LCCG.

Matos et al. (2012) investigaram proteínas envolvidas na osteoclastogênese, como o TNF- α e o TGF- β , em LCCG e LPCG. Os autores verificaram que a expressão do TGF- β era maior nos casos de LCCG do que nas lesões periféricas. Além disso, foi verificada uma correlação positiva entre a expressão do TGF- β e TNF- α em LCCG. No entanto, essa correlação não foi observada em LPCG. Esses achados sugerem que a interação do TNF- α e TGF- β é importante na formação de osteoclastos e na reabsorção óssea na LCCG.

3.4 MICROAMBIENTE DE LESÕES AGRESSIVAS X NÃO AGRESSIVAS

Chuong et al. (1986), ao proporem a classificação das lesões em agressivas e não agressivas, também avaliaram comparativamente variáveis histológicas das duas formas da LCCG no intuito de diferenciá-las. Os autores verificaram que as lesões agressivas apresentaram maior tamanho relativo das células gigantes, no entanto, outros parâmetros analisados como o número de CGM, mitoses em CMO e a área de superfície ocupada pela CGM não foram estatisticamente significantes. Os resultados encontrados sugerem que não se pode prever a agressividade da lesão por meio da análise desses parâmetros histológicos.

Ficarra, Kaban e Hansen (1987), analisando 22 lesões não agressivas e 10 lesões agressivas, verificaram um maior número de CGM e área ocupada por essas células em LCCG agressiva. Os autores sugerem que a associação de dados clínicos e histológicos pode auxiliar na predição do prognóstico e no planejamento do tratamento. Kruse-Lösler et al. (2006) e Reddy et al. (2012), baseados no estudo de Chuong et al (1986), investigaram características microscópicas e verificaram que lesões agressivas apresentam maior número de CGM, área de superfície ocupada pela CGM e maior número de mitoses.

As variáveis microscópicas auxiliam no estudo do comportamento biológico das lesões e conseqüentemente na escolha do tratamento (CHUONG et al., 1986; FICARRA; KABAN; HANSEN, 1987; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; REDDY et al., 2012). No entanto, outros estudos têm sido realizados com o intuito de esclarecer a diferença no comportamento biológico da LCCG, auxiliar a prever o possível curso da doença e também melhor caracterizar o microambiente da LCCG (Quadro 2).

Kruse-Lösler et al. (2006) investigaram, por meio de imunohistoquímica, proteínas envolvidas no ciclo celular (Ki-67 e p-53) verificando que a expressão

dessas proteínas em lesões agressivas e não agressivas são semelhantes, portanto não são úteis para a diferenciação entre lesões agressivas e não agressivas.

O'Malley et al. (1997), com o objetivo de caracterizar o microambiente da LCCG, estudaram por meio de imunohistoquímica, a expressão das proteínas CD-34, CD-68, fator XIIIa, α -actina de músculo liso, Ki-67 e p-53. Os autores verificaram que as células mononucleares da LCCG não apresentavam marcação para o CD-34. Tanto CGM e CMO expressavam a proteína CD68, além dos osteoclastos que margeavam osso normal presente em algumas lesões. As células que expressavam o fator XIIIa foram escassas em ambas as variantes. A proteína α -actina de músculo liso apresentou grande variedade de expressão, sendo negativa em alguns casos e expressa em mais de 70% das células em outros casos estudados (O'MALLEY et al., 1997).

Quadro 2. Principais estudos comparativos de proteínas presentes no microambiente da Lesão Central de Células Gigantes.

Autor	Proteína(s) estudada(s)	Função(ões) da Proteína(s)	Lesão Não Agressiva X Lesão Agressiva
O'Malley et al. (1997)	Ki-67 e p-53	Proteínas envolvidas no ciclo celular	Não há diferença
Vered et al. (2007a)	α -actina de músculo liso	Expressa em miofibroblastos	Não há diferença
Dewsnup et al. (2008)	CD34	Fator de adesão célula-célula Proteína expressa por precursores hematopoiéticos e células endoteliais de capilares	Lesões Agressivas apresentam maior densidade vascular
Tobón-Arroyave et al. (2010)	MMP-1 e MMP-9	Proteases que degradam fibras de colágeno do osso	Lesões Agressivas apresentam maior expressão de MMP-1 e MMP-9
Peacock, Jordan e Schmidt (2012)	VEGF, bFGF, CD31 e CD34	Neoangiogênese, expressas em células endoteliais	Sem diferenças estatisticamente significantes

O'Malley et al. (1997) verificaram, ainda, que pelo menos 80% das CMO possuem fenótipo para fibroblastos. O Ki-67 foi evidenciado somente em CMO, em cerca de 5% e 5,6% das células em lesões agressivas e não agressivas.

Adicionalmente as células que expressavam essa proteína não expressavam CD34, CD68 e fator XIIIa. Rara expressão do p-53 foi observada em CMO nas duas variantes da LCCG. Os investigadores sugerem que a LCCG é uma lesão composta principalmente por fibroblastos (e miofibroblastos) em que macrófagos desempenham um papel secundário.

Vered et al. (2007a), com o intuito de avaliar comparativamente miofibroblastos em lesões agressivas (n=15) e não agressivas (n=24), investigaram a densidade de células expressando α -actina de músculo liso nessas lesões. Os resultados indicaram que a presença de miofibroblastos não possibilita caracterizar lesão agressiva e não agressiva, pois não houve diferença estatisticamente significativa entre as variantes.

Dewsnup et al. (2008) avaliaram comparativamente, através da imunohistoquímica, a expressão da molécula CD34 em 26 amostras de LCCG agressiva e 6 não agressivas. Os resultados demonstram que lesões agressivas possuem uma maior densidade vascular do que LCCG não agressiva, esse achado pode ser útil para identificar lesões mais agressivas passíveis de receber terapia com agente anti-angiogênico.

Tobón-Arroyave et al. (2010) investigaram comparativamente a expressão de enzimas proteolíticas (MMP-1 e MMP-9) em 30 casos de LCCG não agressiva e 12 casos de lesões agressivas. Os resultados indicaram que lesões agressivas apresentam maior expressão de MMP-1 e MMP-9 do que lesões não agressivas, sugerindo que essas proteínas têm papel importante no processo de reabsorção óssea. Além disso, a diferença na expressão dessas proteínas pode auxiliar na diferenciação das formas clínicas (agressiva e não agressiva) da lesão.

Peacock, Jordan e Schmidt (2012) investigaram comparativamente a expressão de proteínas envolvidas na neo-angiogênese (VEGF, bFGF, CD31 e CD34) em 8 amostras de LCCG agressiva e 6 não agressiva, por meio da técnica de imunohistoquímica. Os resultados indicaram que a LCCG pode ser uma lesão vascular proliferativa devido à alta expressão dessas proteínas e que componentes vasculares da LCCG podem ser responsáveis pelo comportamento clínico agressivo, embora não tenha sido encontrado resultado com significância estatística.

Sarode e Sarode (2014) estudaram o canibalismo celular em CGM, definido como quando uma célula grande aprisiona uma célula menor em seu citoplasma, em amostras de LCCG agressivas (n=10), não agressivas (n=6) e em amostras de

LPCG (n=23). Os autores verificaram que LCCG apresentam maior número de CGM com o evento de canibalismo celular do que a LPCG, além disso, o evento de canibalismo celular é maior em lesões agressivas do que lesões não agressivas. Os autores sugerem que a avaliação da frequência de células canibais em LCCG pode auxiliar a prever o comportamento da lesão.

3.5 TRATAMENTO

O tratamento cirúrgico é a modalidade de terapia mais aplicada às LCCG. A enucleação por curetagem consiste no procedimento mais comum (KRUSE-LOSLETER et al., 2006; SUN et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2010; TRIANTAFILLIDOU et al., 2011). No entanto, devido às sequelas que esse tipo de terapia pode acarretar, tratamentos medicamentosos têm sido descritos na literatura e os resultados dessas terapias variam desde remissão total até evolução da lesão. As principais terapias alternativas são: injeções de interferon alfa-2a; injeções intralesionais de glicocorticoides e uso de calcitonina (spray nasal e injeções subcutâneas).

Glicocorticoides são hormônios esteroides derivados do colesterol e apresentam várias funções no corpo humano, dentre elas a atividade anti-inflamatória (BECKER, 2013). O tratamento com injeções intralesionais de glicocorticoides foi baseado na similaridade das células gigantes presentes na LCCG com as da sarcoidose (NOGUEIRA et al., 2012). Acredita-se que o mecanismo de atuação se dá pela inibição da reabsorção óssea através da indução de apoptose em osteoclastos e da produção de proteases responsáveis pela reabsorção óssea. Além disso, podem agir suprimindo componentes inflamatórios e angiogênicos da LCCG (CARLOS; SEDANO, 2002; POGREL, 2003; DE LANGE; VAN DEN AKKER; VAN DEN BERG, 2007a; NOGUEIRA et al., 2010).

Terry e Jacoway (1994) foram os primeiros a proporem a terapia de injeções intralesionais com glicocorticoides. Em protocolo descrito pelos autores, o medicamento triancinolona acetona foi diluído em uma proporção de 1:1 com solução anestésica. Dois mililitros da solução a cada 2 centímetros de radiolucidez da lesão visualizados na imagem radiográfica eram aplicados dentro da lesão. Era realizada uma aplicação intralesional semanal, durante seis semanas. O quadro 3 resume os principais relatos de caso descritos na literatura sobre essa terapia. Em síntese, são descritos 51 casos tratados com injeções intralesionais de

glicocorticoides, sendo que cerca de 66% dos casos obtiveram boa resposta e 9,8% dos casos teve resposta negativa. O tratamento adicional variou de novas injeções do medicamento até procedimentos cirúrgicos mais radicais, tais como maxilectomia, e foi necessário em 47,06% dos casos descritos.

A calcitonina é um hormônio secretado pelas células C da tireoide capaz de inibir osteoclastos (ALLON; ANAVI; CALDERON, 2009). Atua inibindo a motilidade das CGM da LCCG (FLANAGAN et al., 1988) e nas CMO induz a inibição da síntese de DNA (DE LANGE et al., 1999). O tratamento com esse hormônio foi baseado na semelhança entre a LCCG e o Tumor Marrom do Hiperparatireoidismo (REGEZI; POGREL, 2004) e suportado pela teoria de que as células gigantes na LCCG são osteoclastos (FLANAGAN et al., 1988; HARRIS, 1993; ITONAGA et al., 2003; TORABINIA; RAZAVI; SHOKROLAHI, 2011).

Harris (1993) foi um dos primeiros autores a utilizar a calcitonina no tratamento de LCCG com injeção subcutânea desse hormônio em 3 casos de LCCG e um de LPCG, em substituição ao tratamento cirúrgico. O protocolo aplicado foi: uma injeção subcutânea diária de 100 UI de calcitonina (humana sintética ou de salmão) durante um período que variou de 12 a 14 meses. O uso da calcitonina humana sintética foi substituído pelo uso da calcitonina de salmão, a qual é significativamente mais potente e atua por meio do mesmo receptor (POGREL et al., 1999; SOUTER; BIRD; WORTHINGTON, 2006).

A calcitonina está disponível comercialmente nas formas de solução para injeções subcutâneas, intramuscular ou intravenosa e na forma de spray nasal (SOUTER; BIRD; WORTHINGTON, 2006). Não pode ser administrada por via oral, pois é inativada pelo ácido gástrico (ALLON; ANAVI; CALDERON, 2009). A modalidade spray intranasal possibilita maior comodidade ao paciente, no entanto uma dose maior é utilizada, pois a mucosa nasal tem uma absorção do medicamento que varia entre 30 a 50% em relação às outras vias de administração. (POGREL et al., 1999). O tratamento com interferon e glicocorticoides são mais invasivos se comparados com o uso de spray de calcitonina (ALLON; ANAVI; CALDERON, 2009). A administração do spray reduz as visitas do paciente ao profissional, as intervenções e o custo do tratamento, no entanto exige dedicação e disciplina (ALLON; ANAVI; CALDERON, 2009). O quadro 4 resume os principais estudos que utilizaram a calcitonina como terapia para o tratamento da LCCG. O resumo dos casos descritos na literatura mostra que 52 lesões foram tratadas com a

calcitonina, o tratamento teve uma resposta boa em 84,6% dos casos, o tratamento falhou em 7,69% dos casos, e tratamentos adicionais, sendo a cirurgia por motivos estéticos o mais comum, se deu em 21,15% dos casos. A descontinuação do tratamento por parte do paciente se deu em dois casos (3,84%).

O interferon é uma citocina com propriedades antiviral e anti-angiogênica capaz de suprimir a produção do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) que está envolvido na neo-angiogênese de tumores (DE LANGE; VAN DEN AKKER; VAN DEN BERG, 2007a). A observação de que as LCCG são altamente vascularizadas, tais como hemangiomas, e que um nível elevado de FGF na urina poderia ser encontrado em pacientes com LCCG levaram a hipótese de que essa citocina poderia ser utilizada como um agente terapêutico contra a doença (KABAN et al., 1999). São descritos 43 casos tratados com o protocolo proposto por Kaban et al. (1999), que é de curetagem da lesão seguida por injeções subcutâneas de interferon. Cerca de 88% dos casos descritos obtiveram boa resposta com a terapêutica, sendo que em quatro casos não são descritos os resultados, pois ainda se encontravam em tratamento. O tratamento adicional foi necessário em 11,6% dos casos descritos. O quadro 5 resume os principais estudos que utilizaram essa medicação como tratamento.

O uso combinado desses medicamentos acima citados ou a utilização de outros medicamentos (tais como agentes que inibem a reabsorção óssea como o Denosumab) no tratamento da LCCG são descritos na literatura. O quadro 6 resume os principais trabalhos sobre tratamentos combinados e outras modalidades terapêuticas da LCCG.

Há controvérsias sobre qual o melhor tratamento a ser adotado. Para Regezi e Pogrel (2004), a melhor terapia seria ganhar controle sobre as células fusiformes mononucleares, pois esta é a linhagem celular em proliferação. Os autores afirmam que para o uso de glicocorticoides, deve-se levar em consideração efeitos colaterais como a reabsorção óssea e osteoporose.

Para alguns autores, a terapia medicamentosa deve ser restrita a lesões menos extensas e de crescimento lento (DE CORSO et al., 2006; FARRIER et al., 2006). Para Theologie-Lygidakis et al. (2011), não existe evidencia suportando o uso de terapias não cirúrgicas. Além disso, os autores acreditam que várias experiências mal sucedidas com o uso de glicocorticoides foram descritas e que a terapia com

calcitonina é longa e por isso desvantajosa em lesões com crescimento rápido e, finalmente, o uso de interferon possui vários efeitos colaterais.

Suárez-Roa et al. (2009) realizaram uma revisão sistemática sobre intervenções medicamentosas para a LCCG. Somente um ensaio clínico randomizado sobre terapia com calcitonina atendeu aos critérios propostos para a avaliação (DE LANGE et al., 2006b). Os autores concluíram que existe necessidade de maiores evidências sobre a efetividade e segurança dos diferentes tipos de tratamentos da LCCG. Osterne et al. (2013) conduziram um estudo meta-analítico sobre a terapia com injeções intralesionais de glicocorticoides. Apesar das limitações presentes no estudo, os autores sugeriram que essa terapia pode ser aplicada como um tratamento de primeira opção, além disso, ressaltam a necessidade de que estudos prospectivos sobre a temática sejam realizados.

Quadro 3. Resumo dos principais artigos sobre tratamento medicamentoso da LCCG com injeção intralesional de corticosteroide.

Autor	Casos (n)	Sítio	Tratamento Prévio	Protocolo	Tratamento Adicional	Resposta ^a
Terry e Jacoway (1994)	4	Mandíbula	-	Triancinolona acetonaída 10mg/mL + Marcaína 0.5%, 1:1; 2mL por 2cm de lesão. Semanal durante 6 semanas	Em um caso: uma sessão a mais + curetagem	3 respostas boas e 1 resposta moderada
Kermer, Millesi e Watzke (1994)	1	Mandíbula	-	3mL (não mais de 2mL por 2cm de lesão) de triancinolona acetonaída 10mg + Lidocaína 0.5%. Semanal durante 6 semanas	Recorrência tratada com mesmo protocolo	Resposta Boa
Rajeevan e Soumithran (1998)	1	Mandíbula	-	Triancinolona acetonaída 10mg + Lidocaína 0.5%, 1:1, 2mL por 2cm de lesão. Semanal durante 6 semanas.	-	Resposta Boa
Khafif et al (2000)	1	Maxila	Curetagem	Triancinolona acetonaída 40mg/mL + Marcaína 0.5%, 1:1. Semanal durante 6 semanas	-	Resposta Boa

Quadro 3. Resumo dos principais artigos sobre tratamento da LCCG com injeção intralesional de corticosteroide (continuação).

Autor	Casos (n)	Sítio	Tratamento Prévio	Protocolo	Tratamento Adicional	Resposta^a
Adornato e Paticoff (2001)	1	Mandíbula	-	Triancinolona acetona (6 ou 7 cm ³) + Marcaïne 0.5%, 1:1 Semanal durante 6 semanas	-	Resposta Boa
Kurtz et al (2001)	1	Mandíbula	Cirurgia	15cm ³ de triancinolona acetona 10mg/mL + Marcaïne 0.5%, 1:1. Semanal durante 6 semanas	6 injeções semanais	Resposta Boa
Carlos e Sedano (2002)	4	2 Mandíbula; 2 Maxila	-	Triancinolona acetona 10mg + Lidocaína 2% ou Marcaïne ou Bupivacaína, 6mL, 4 – 20 injeções	Curetagem adicional em um caso	3 Respostas boas 1 moderada
Abdo et al (2005)	1	Mandíbula	Curetagem	Injeção intralesional de Corticosteróides. Semanal durante 3 semanas	Uma injeção após dois meses	Resposta Boa
Sezer et al (2005)	1	Mandíbula	-	5mL de triancinolona acetona 10mg/mL + Lidocaína 2%, 1:1. Semanal durante 6 semanas	-	Resposta Boa

Quadro 3. Resumo dos principais artigos sobre tratamento da LCCG com injeção intralesional de corticosteroide (continuação).

Autor	Casos (n)	Sítio	Tratamento Prévio	Protocolo	Tratamento Adicional	Resposta^a
Comert, Turanli e Ulu (2006)	1	Maxila	-	Injeção intralesional Prednisona 60 mg + Lidocaína 40 mg, semanal durante 2 meses e Fluocortolona durante 2 meses	Excisão cirúrgica	Resposta Moderada
Graham et al (2008)	1	Maxila	-	Triancinolona acetonaída 25mg + Bupivacaína, 1:1. Quinzenal, 6 injeções	Enucleação cirúrgica	Resposta Moderada
Mohanty e Jhamb (2009)	2	Mandíbula	-	4 e 6 mL de triancinolona acetonaída 10mg/mL + Lidocaína 2%, 1:1. Semanal durante 5 e 6 semanas	Um caso: três injeções adicionais	Resposta Boa
Roberts et al (2009)	2	Maxila	-	Maxilectomia parcial + 3 mL de triancinolona acetonaída 40mg/mL. Semanal, 5 semanas. Caso 2: maxilectomia	Recorrência após 8 meses, tratado por maxilectomia	Resposta Moderada
Wendt et al (2009)	1	Maxila	-	Triancinolona acetonaída 10mg + Bupivacaína 0.5%, 1:1, 2mL, Semanal durante 11 semanas	-	Resposta Boa

Quadro 3. Resumo dos principais artigos sobre tratamento da LCCG com injeção intralesional de corticosteroide (continuação).

Autor	Casos (n)	Sítio	Tratamento Prévio	Protocolo	Tratamento Adicional	Resposta^a
Nogueira et al (2010)	21	8 Maxila; 13 Mandíbula	-	Triancinolona hexacetonida 20mg/mL + Lidocaína 2%. 1:1, 10mL por 1cm ³ de area radiolúcida da lesão. Quinzenal, 6 injeções	Ressecção cirúrgica em dois casos; osteoplastia em oito casos (estética)	2 respostas negativas; 4 respostas moderadas; 15 respostas boas
Ferretti e Muthray (2011)	1	Mandíbula	-	Triancinolona acetonaída 40mg/mL diluída a 5mg/mL + Bupivacaína 0,5%, 6mL. Quinzenal, 3 injeções	-	Resposta Boa
Shirani et al (2011)	1	Mandíbula	-	Triancinolona acetonaída 40mg/mL + Lidocaína 1%, 1:1. Semanalmente durante 6 semanas	Ressecção cirúrgica	Resposta Negativa
Silva et al (2012)	1	Mandíbula	-	1mL de Triancinolona acetonaída 40mg/mL + Mepivacaína, 7 injeções quinzenais + três mensais. Alendronato de sódio semanal (70mg) e carbonato de cálcio via oral diário (500mg) durante 7 semanas	-	Resposta Boa

Quadro 3. Resumo dos principais artigos sobre tratamento da LCCG com injeção intralesional de corticosteroide (continuação).

Autor	Casos (n)	Sítio	Tratamento Prévio	Protocolo	Tratamento Adicional	Resposta^a
Rubio-Correa et al (2012)	1	Maxila	-	Seis ciclos de injeção intralesional de triancinolona acetona	Ressecção cirúrgica + reconstrução	Resposta Negativa
Choi and Kraut (2013)	1	Mandíbula	-	18 mL de Triancinolona + Marcaína 1:1. Semanal durante 6 semanas	-	Resposta Boa
Da Silva Sampieri et al (2013)	1	Mandíbula	Calcitonina	2mL de triancinolona acetona + Articaína 2%, 1:1. Semanal durante 6 semanas	Cisto infectado secundariamente 3,5 anos após tratamento	Resposta Boa
Fonseca et al (2013)	1	Mandíbula	-	Triancinolona acetona 40mg/mL + Lidocaína, 1:1, 0,3mL. 6 injeções. Os autores também utilizaram Ethamolin.	Curetagem	Resposta Moderada

Quadro 3. Resumo dos principais artigos sobre tratamento da LCCG com injeção intralesional de corticosteroide (continuação).

Autor	Casos (n)	Sítio	Tratamento Prévio	Protocolo	Tratamento Adicional	Resposta ^a
El Hadid, Ghanem, Helmy (2015)	1	Mandíbula		5mL de triancinolona acetonia 10mg/mL + Lidocaína 2%. Duas vezes por semana durante 12 semanas	Curetagem (a paciente apresentou características faciais da síndrome de Cushing como efeito colateral)	Resposta Boa

^aDe acordo com Nogueira et al. (2010). Para análise da terapia com corticosteroide intralesional um sistema de escores com quatro itens foi utilizado: 1 – estabilização ou regressão da lesão; 2 – ausência de sintomas; 3 – aumento da radiopacidade em radiografias; 4 – aumento na dificuldade de difusão da solução na lesão após múltiplas aplicações. Resposta Boa – todos os escores presentes; Resposta Moderada – Dois ou três escores; Resposta Negativa – um ou nenhum escore.

Quadro 4. Resumo dos principais artigos sobre tratamento da LCCG com calcitonina.

Autor	Casos (n)	Sítio	Tratamento Prévio	Protocolo	Tratamento Adicional	Resposta ^b
Harris (1993)	4 (1 caso de LPCG)	2 Mandíbula 2 Maxila	Procedimentos cirúrgicos	Injeção subcutânea diária de calcitonina humana sintética ou de salmão 100 UI. Durante 12 – 14 meses	Um paciente apresentou recorrência, tratada com injeção diária de calcitonina humana sintética 4x/dia inalação de calcitonina de salmão (100UI) durante 6 meses; LPCG – removida cirurgicamente	3 respostas boas; 1 boa resposta após novo tratamento
Pogrel et al (1999)	2	Mandíbula	Curetagem cirúrgica e Terapia com glicocorticóide (Protocolo de Terry e Jacoway)	Injeção subcutânea de calcitonina humana sintética ou de salmão 100UI/dia. Spray nasal de calcitonina de salmão 200 UI/dia. Durante 19 e 21 meses.	Um caso: cirurgia motivos estéticos	Resposta Boa

Quadro 4. Resumo dos principais artigos sobre tratamento da LCCG com calcitonina (continuação).

Autor	Casos (n)	Sítio	Tratamento Prévio	Protocolo	Tratamento Adicional	Resposta^b
De Lange et al (1999)	4	Mandíbula	Injeção intralesional de corticosteroide e curetagem	Injeção subcutânea diária de calcitonina 50UI, 87,5UI ou 100 UI. Spray nasal de calcitonina 200 UI. Durante 12 a 19 meses	-	Resposta Boa
O'Regan et al (2001)	1	Maxila	-	Injeção subcutânea diária de calcitonina humana sintética 100 UI + ciclizina 50mg via oral (náusea e vômitos). Durante 15 meses	Cirurgia por motivos estéticos	Resposta Boa
Pogrel (2003)	10	Mandíbula	Curetagem e protocolo recomendado por Terry e Jacoway	Injeção subcutânea diária de calcitonina de salmão 100 UI; Um paciente: spray nasal de calcitonina de salmão 100 UI. Durante 19 – 27 meses	Um caso – recorrência tratada com calcitonina + curetagem. Outro caso – paciente abandonou tratamento após 4 meses e curetagem foi realizada.	9 respostas boas; uma resposta negativa
Dominguez et al (2004)	3	Não informado	-	Calcitonina de salmão intranasal 100 UI/dia. Durante 12 – 19 meses	-	Resposta Boa

Quadro 4. Resumo dos principais artigos sobre tratamento da LCCG com calcitonina (continuação).

Autor	Casos (n)	Sítio	Tratamento Prévio	Protocolo	Tratamento Adicional	Resposta ^b
De Lange et al (2006b)	14 (3 com mais de uma lesão)	10 Mandíbula; 6 Maxila	-	200 UI de Calcitonina de salmão intranasal diariamente ou placebo durante 3 meses (7 pacientes por grupo); Após 3 meses – todos pacientes receberam calcitonina durante 1 ano.	-	Após três meses: 4 respostas negativas (3 no grupo da calcitonina e 1 no grupo placebo) Ao final do tratamento: 2 respostas negativas (grupo placebo) e 11 respostas boas ou moderadas. Um paciente descontinuou tratamento

Quadro 4. Resumo dos principais artigos sobre tratamento da LCCG com calcitonina (continuação).

Autor	Casos (n)	Sítio	Tratamento Prévio	Protocolo	Tratamento Adicional	Resposta^b
Souter et al (2006)	1	Osso temporal	Cirurgia exploratória (diagnóstico prévio de exostose)	Injeção subcutânea diária de calcitonina de salmão (100 UI) durante 12 meses	-	Resposta Boa
Vered et al (2007b)	5	4 Mandíbula; 1 Maxila	Curetagem	Spray Nasal de calcitonina 200 UI uma ou duas vezes ao dia. Durante 13 – 64 meses	Curetagem em quarto casos, em um dos casos, realizada duas vezes.	1 resposta boa; 3 moderadas e 1 resposta negativa
Borges et al (2008)	4 (1 LPCG)	3 Mandíbula; 1 Maxila	Cirurgia	Calcitonina de salmão subcutânea (100 UI) e spray intranasal (200 IU). Durante 6 – 28 meses	Cirurgia motivos estéticos seria realizada	Resposta Boa
Allon et al (2009)	5	3 Mandíbula; 2 Maxila	-	Spray intranasal de calcitonina de salmão 200 UI 2x ou 1x ao dia. Duração do tratamento de 9 – 60 meses	-	Resposta Boa

Quadro 4. Resumo dos principais artigos sobre tratamento da LCCG com calcitonina (continuação).

Autor	Casos (n)	Sítio	Tratamento Prévio	Protocolo	Tratamento Adicional	Resposta^b
Romero et al (2011)	1	Mandíbula	-	Spray intranasal de Calcitonina de salmão (200µg/d) + cálcio (0,5g/d) + vitamina D (400 UI). Durante 36 meses, com um mês de interrupção/ano	Remodelação cirúrgica da mandíbula 2 anos após o diagnóstico	Resposta Boa

^bPara análise da terapia com calcitonina, um sistema de escores com três itens foi utilizado: 1 – estabilização ou regressão da lesão; 2 – ausência de sintomas; 3 – aumento da radiopacidade nas radiografias. Uma resposta Boa foi considerada quando todos os escores estavam presentes. Uma resposta Moderada quando dois ou um item e quando nenhum item estava presente foi considerada resposta Negativa. Baseado em critérios adotados por Nogueira et al (2010).

Quadro 5. Resumo dos principais artigos sobre tratamento da LCCG com interferon.

Autor	Casos (n)	Sítio	Tratamento Prévio	Protocolo	Tratamento Adicional	Resposta^c
Kaban et al (1999)	1	Mandíbula	Enucleação, hemimandibulectomia, injeção subcutânea de calcitonina	3x10 ⁶ UI, 4.4x10 ⁶ IU e 6x10 ⁶ UI de Interferon alpha-2a subcutâneo diariamente durante 12 meses	-	Resposta Boa
Collins (2000)	1	Mandíbula		1x10 ⁶ IU de Interferon alpha, durante 9 meses	-	Resposta Boa
Kaban et al (2002)	8	6 Mandíbula; 2 Maxila		Curetagem + Injeção subcutânea de 3x10 ⁶ UI de Interferon α2a ou α2b. Durante 6 – 8,4 meses	-	Resposta Boa
Goldman et al (2005)	1	Maxila	Cirurgia + prednisolona e calcitonina	Cirurgia + Injeção subcutânea diária de 3x10 ⁶ UI/m ² de interferon-alfa, após efeitos colaterais dosagem de 1,5 x10 ⁶ e após isso 9x10 ⁶ UI durante 16 meses	-	Resposta boa

Quadro 5. Resumo dos principais artigos sobre tratamento da LCCG com interferon (continuação).

Autor	Casos (n)	Sítio	Tratamento Prévio	Protocolo	Tratamento Adicional	Resposta^c
De Lange et al (2006a)	2	1 Mandíbula; 1 Maxila	Spray nasal de Calcitonina	Injeção subcutânea diária de 3×10^6 UI até 9×10^6 UI de $\text{INF}\alpha 2\text{a}$. Dosagem semanal de 180 μg . Durante 10 – 14 meses	Vários efeitos colaterais relatados. Um paciente recebeu injeção subcutânea de calcitonina (100UI). Intervenção cirúrgica ainda era necessária	Boa resposta
Kaban et al (2007)	26	20 Mandíbula; 6 Maxila	-	Enucleação seguida de injeções subcutâneas diárias de 3×10^6 UI/m ² de interferon-alfa 2a ou 2b, após aproximadamente 6 dias da cirurgia. Durante 3,2 – 16,6 meses	Em dois pacientes a medicação foi trocada para zolendronato devido aos efeitos colaterais. Um paciente submeteu-se a ressecção em bloco	22 respostas boas; 4 ainda em tratamento

Quadro 5. Resumo dos principais artigos sobre tratamento da LCCG com interferon (continuação).

Autor	Casos (n)	Sítio	Tratamento Prévio	Protocolo	Tratamento Adicional	Resposta ^c
Baker et al (2008)	1	Maxila	-	Enucleação, e após dois meses, injeção subcutânea diária de interferon alfa-2a (3×10^6 UI/m ²)	-	Resposta Boa
De Lange et al (2009)	1	Mandíbula	Corticosteroide e calcitonina	Imatinib 400mg + 180µg interferon-alfa por dia durante 9 meses	-	Resposta boa
O'Connel e Kearns (2013)	2	1 Mandíbula; 1 Maxila.		Enucleação + injeção subcutânea diária de 3×10^6 UI de interferon $\alpha 2$ durante 12 meses	Uma recorrência após quatro anos tratada com o mesmo protocolo	Resposta Boa

^cBaseado em critérios adotados por com Nogueira et al (2010). Para análise da terapia com interferon, um sistema de escores com três itens foi utilizado: 1 – estabilização ou regressão da lesão; 2 – ausência de sintomas; 3 – aumento da radiopacidade nas radiografias. Uma resposta Boa foi considerada quando todos os escores estavam presentes. Uma resposta Moderada quando dois ou um item e quando nenhum item estava presente foi considerada resposta Negativa.

Quadro 6. Resumo dos principais artigos sobre tratamentos combinados e outras modalidades de tratamentos não cirúrgicos da LCCG.

Autor	Casos (n)	Sítio	Tratamento Prévio	Protocolo	Tratamento Adicional	Resposta^d
Schutz et al (2010)	1	Mandíbula	Spray intranasal de Calcitonina	30mg de Triancinolona acetona, 4 injeções a cada 3 semanas. Curetagem e três meses após injeção subcutânea diária de 3×10^6 UI de interferon alfa-2a, durante um ano.	-	Resposta Boa
Rachmiel et al (2012)	1	Mandíbula	-	Triancinolona acetona 10mg/mL + Lidocaína, 1mL por cm de radiolucidez. Semanal durante 6 semanas + Spray Nasal de Calcitonina 200 UI/dia durante 3 meses.	Curetagem e ostectomia periférica após três meses de tratamento	Resposta Moderada
Schreuder (2014)	1	Maxila	Calcitonina e Interferon alfa-2a + calcitonina	Injeção subcutânea de Denosumab 120mg/1x ao mês, durante 12 meses. Dose adicional de 120mg no 8º e 15º dias do primeiro mês + Suplemento de Cálcio e Vitamina D.	-	Resposta Boa

^dBaseado em critérios adotados por com Nogueira et al (2010). Para análise da terapia com outros medicamentos, um sistema de escores com três itens foi utilizado: 1 – estabilização ou regressão da lesão; 2 – ausência de sintomas; 3 – aumento da radiopacidade nas radiografias. Uma resposta Boa foi considerada quando todos os escores estavam presentes. Uma resposta Moderada quando dois ou um item e quando nenhum item estava presente foi considerada resposta Negativa.

3.5.1 Glicocorticoide, calcitonina e seus receptores

Glicocorticoides são hormônios produzidos pelo córtex da glândula adrenal e são utilizados no tratamento de vários processos de origem autoimune e inflamatórios. Efeitos adversos, tais como osteoporose, hipertensão, diabetes e glaucoma são descritos e pesquisas sobre as respostas celulares a esse hormônio auxiliam a desenvolver terapias que levam em conta o risco/benefício do uso dessa medicação (OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013).

Os principais efeitos dos glicocorticoides consistem no metabolismo de proteínas e carboidratos, reduzindo a captação e utilização da glicose, induzindo a gliconeogênese, reduzindo a síntese de proteínas e aumentando a sua degradação, principalmente no músculo (RANG et al., 2004). Além disso, diminuem a absorção do cálcio e aumentam sua excreção pelo rim, o que pode levar a osteoporose. Outro efeito adverso resultante de terapias prolongadas com esses medicamentos é a atrofia do córtex da glândula suprarrenal (RANG et al., 2004).

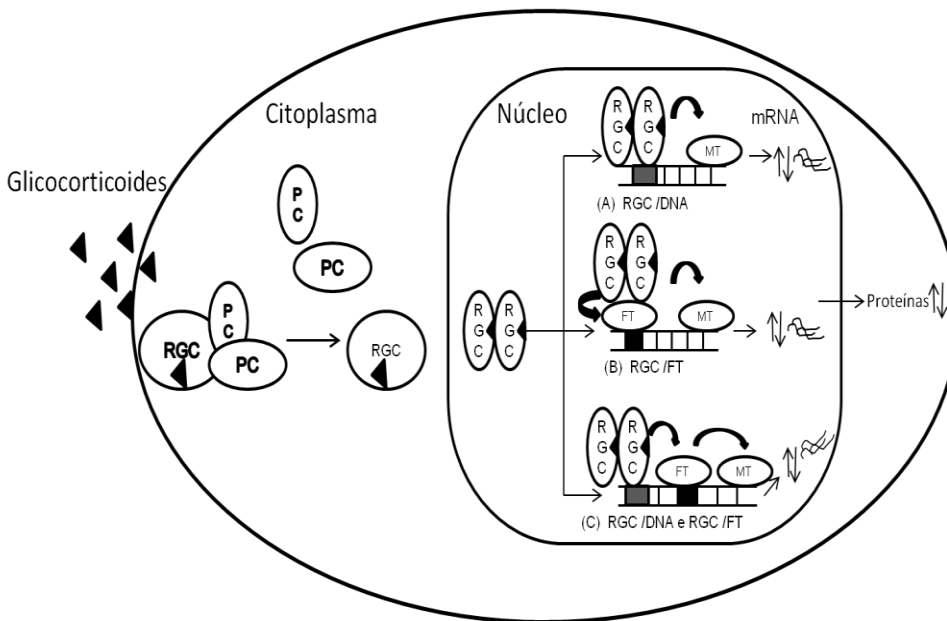
Os glicocorticoides são capazes de induzir imunossupressão pela redução da transcrição do gene da Interleucina-2, restringindo a capacidade proliferativa de linfócitos T auxiliares e, também, diminuem a transcrição de genes do TNF-alfa, Interferon-gama, e Interleucina-1. Esses efeitos se dão através da ligação do hormônio com seu receptor, na maioria das vezes induzindo respostas aos esteroides no DNA celular, reprimindo ou induzindo certos genes. O hormônio é capaz de inibir fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) (RANG et al., 2004).

Outras ações reguladoras do glicocorticoide consistem na redução da atividade das células mononucleares, na diminuição da proliferação de vasos sanguíneos e ainda na diminuição de secreção do fator de estimulação de colônias de granulócitos/macrófagos. Nos fibroblastos os glicocorticoides diminuem a função da célula-alvo, levando a menor produção de colágeno e glicosaminoglicanos (RANG et al., 2004). Apesar de a osteoporose ser descrita como um importante efeito colateral, diversos estudos demonstram que o glicocorticoide é importante também para a atividade dos osteoblastos e consequente formação óssea (PHILLIPS et al., 2006; AZUMA et al., 2010; LU et al., 2012; MA et al., 2013).

O Receptor de glicocorticoide (RGC) apresenta algumas isoformas, dentre elas o RGC- α e RGC- β . Acredita-se que a isoforma RGC- β não é capaz de se ligar a

agonistas do hormônio, além disso, pode inibir a atividade da outra isoforma. Essa atividade sugere que RGC- β pode levar à resistência à terapia com glicocorticoides, enquanto a isoforma RGC- α é a forma clássica do RGC (NICOLAIDES et al., 2010; OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013). A figura 2 resume a as vias de sinalização reguladas pelo receptor de glicocorticoide clássico.

Figura 2. Esquema das vias de ativação de genes pelo receptor de glicocorticoide- α .



Esquema adaptado de Zhou e Cidlowski (2005). Após ligação com o glicocorticoide o seu receptor (RGC α) dissocia-se das proteínas chaperonas (PC) e transloca para o núcleo da célula. No núcleo o receptor de glicocorticoide se dimeriza e modula a transcrição gênica via: (A) ligação direta com o DNA; (B) interação com outros fatores de transcrição (FT); (C) interação tanto com DNA quanto fatores de transcrição. O resultado dessa interação leva a alterações de proteínas. MT – maquinário da transcrição. Fonte: adaptado Zhou e Cidlowski, 2005.

O osso é o principal tecido onde a calcitonina exerce sua função, inibindo a reabsorção óssea, por meio da ligação com receptor específico presente nos osteoclastos. No rim atua promovendo a diminuição da reabsorção de íons cálcio e de fosfatos nos túbulos proximais. A secreção da calcitonina é controlada principalmente pela concentração plasmática do íon cálcio (RANG et al., 2004). A regulação dos níveis de Ca^{2+} é importante, pois um aumento desse íon no interior da célula faz parte do mecanismo de transdução de sinais de várias linhagens celulares (RANG et al., 2004). Além de agir sobre o tecido ósseo, tem-se descrito outras funções da calcitonina, incluindo efeitos analgésicos, efeitos sobre o sistema

nervoso central, inibição do crescimento de células tumorais no câncer de mama (CHIHARA et al., 1982; LACROIX; SIWEK; BODY, 1998; LYRITIS; TROVAS, 2002). A família da calcitonina inclui outros hormônios que possuem alguma semelhança estrutural com a calcitonina: o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina; a amilina; adrenomedulina e adrenomedulina 2 (NAOT; CORNISH, 2008).

O receptor de calcitonina (RCT) é um receptor da classe dos receptores acoplados à proteína G sendo expresso em diversas linhagens celulares, sugerindo que esse hormônio possui várias funções no nosso organismo (FINDLAY; SEXTON, 2004). A família dos receptores para os peptídeos da família da calcitonina são compostos da combinação de dois receptores acoplados à proteína G de sete domínios transmembrana e consistem no receptor clássico (RCT) e o receptor semelhante ao receptor de calcitonina, os quais podem estar ligados a proteínas modificadoras (RAMPS), formando receptores diferentes que modificam a afinidade aos diferentes hormônios da família da calcitonina (NAOT; CORNISH, 2008).

Cafforio et al. (2009) demonstraram que linfócitos T e B humanos também expressam RCT. A expressão é variável, mas identificada em todos os estágios funcionais dessas linhagens celulares, sendo que uma maior intensidade é identificada em células de memória. Além disso, o RCT está expresso também nas células T e B ativadas, sugerindo que o receptor tem papel importante na ativação desses linfócitos. Os autores sugerem que RCT promove um influxo de cálcio para o ambiente intracelular, levando à proliferação celular das células T enquanto que nenhum efeito citotóxico ou apoptótico é ocasionado pela ativação desses receptores.

No intuito de justificar o tratamento medicamentoso da LCCG tem-se investigado a presença desses receptores nas células dessa lesão, no entanto os estudos são escassos e com resultados divergentes.

Tobón-Arroyave et al. (2005) investigaram a expressão dos receptores de calcitonina e glicocorticoide em 27 casos de LCCG agressiva e 10 casos de não agressiva. Os autores avaliaram, por meio da imunohistoquímica, a porcentagem de células que expressavam os receptores em oito campos microscópicos no aumento de 400x. A proporção foi, em seguida, transformada em escores (0, 1, 2 ou 3) e multiplicada pelo escore da intensidade de marcação. Os autores verificaram forte marcação do RGC no núcleo e citoplasma de CGM, células endoteliais e CMO. Os resultados indicaram que não houve diferença na expressão desse receptor nas

variantes da LCCG. Imunorreatividade para o RCT foi fracamente detectada no citoplasma de CGM e núcleo de células endoteliais e CMO. Houve maior expressão em lesões agressivas do que em lesões não agressivas. A análise das células não foi individualizada, ou seja, foi avaliado o total de células, independente se era CGM ou CMO.

Vered, Buncher e Dayan (2006) investigaram, por meio da imunohistoquímica, os receptores RGC e RCT em 41 amostras de LCCG primárias e calcularam a porcentagem de células mononucleares e multinucleadas positivas do total de células, pela análise de um campo microscópico no aumento de 100x. Cinquenta e um por cento (51%) das LCCG apresentavam marcação intensa (>50% das células positivas) para o RGC nas CMO e CGM, e 36,6% apresentavam marcação intensa para o RCT nas CMO e CGM. Todas as lesões foram positivas para o RGC e somente 56,1% para o RCT. Os autores não encontraram associação entre a intensidade de marcação dos receptores. Nesse estudo não houve classificação das lesões em agressivas e não agressivas e a análise da porcentagem de células mononucleares e gigantes multinucleadas não foi individualizada para cada tipo celular.

Vered et al. (2007b) avaliaram a expressão de RGC e RCT em três amostras de pacientes tratados com calcitonina e encontraram diferentes padrões de expressão desses receptores. As CMO exibiram um padrão de expressão difuso para o RCT e RGC, já as CGM foram pouco reativas ou negativas para o RCT e exibiram um padrão difuso ou quase negativo para o RGC. Houve uma queda na expressão dos RCT após tratamento com calcitonina, o que pode ser devido ao efeito de fuga que o tratamento prolongado com essa medicação promove.

Nogueira et al. (2012) avaliaram a expressão dos receptores em 18 casos de LCCG (9 agressivas e 9 não agressivas), em que todos os pacientes foram tratados com injeções intralesionais de glicocorticoide. A técnica de imunohistoquímica foi utilizada para avaliar a expressão dos receptores e quantificar as CMO e CGM positivas para os receptores em dez campos microscópicos no aumento de 400x. A marcação do RGC foi verificada no núcleo de CMO e CGM e não houve diferença entre as variantes clínicas (agressivas e não agressivas). As lesões que apresentaram um bom resultado ao tratamento apresentavam maior expressão do receptor. A marcação do RCT foi verificada no citoplasma e núcleo das CGM e CMO

e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre as variantes clínicas da LCCG e entre os resultados do tratamento.

Com base na literatura, pode ser observada uma relação entre glicocorticoides e receptores de calcitonina. Estudos demonstram que o uso de glicocorticoide pode aumentar a expressão de receptores de calcitonina (KUROKAWA; MICHELANGELI; FINDLAY, 1991; FRENO et al., 1998). Corroborando com essa hipótese Nogueira et al. (2012a) verificaram que a intensidade de marcação do RCT era maior após tratamento com injeções intralesionais de glicocorticoides.

3.6 REABSORÇÃO ÓSSEA NA LCCG

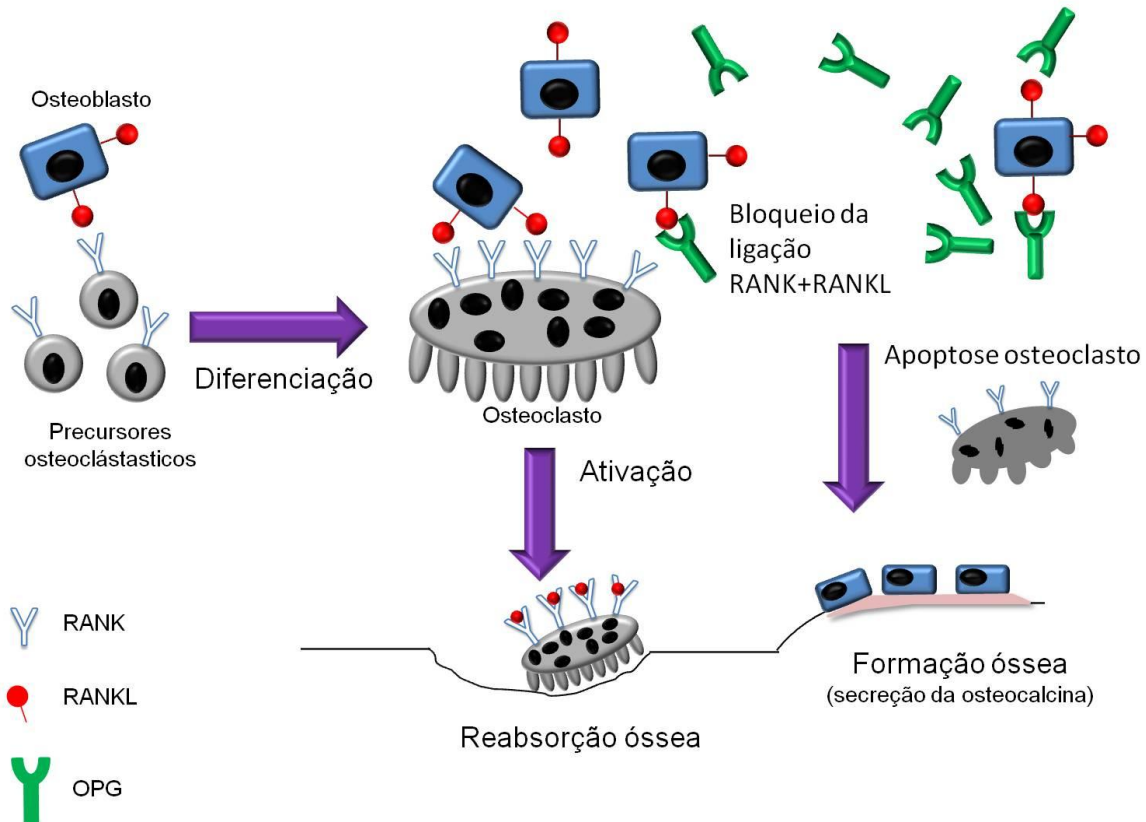
A supressão ou controle da reabsorção óssea consiste em uma importante estratégia terapêutica para reduzir a perda óssea. Um mecanismo importante para o controle da reabsorção envolve três principais proteínas: osteoprotegerina (OPG), Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B (RANK) e seu ligante (RANKL) (TROUVIN; GOEB, 2010). A remodelação óssea é uma tríade: RANKL se liga ao seu receptor (RANK) induzindo a diferenciação, ativação e sobrevivência de osteoclastos, enquanto a OPG atua como um receptor para RANKL, inibindo a ativação de osteoclastos e a reabsorção óssea, estimulando osteoblastos, resultando em neoformação óssea (LIU et al., 2010) (Figura 3).

O osteoblasto, uma vez em função, secreta a osteocalcina (OC), um marcador de neoformação óssea (RAZZAQUE, 2011). A OC é uma proteína produzida por osteoblastos ativos e uma de suas funções tem relação com a ligação do cálcio à matriz óssea. Níveis séricos dessa proteína são usados para determinar o nível de atividade dos osteoblastos e formação óssea (RAZZQUE, 2011). As células que produzem OC podem ser consideradas da linhagem osteoblástica e a expressão dessa proteína pode indicar a maturidade da célula (MURATA et al., 2005)

Liu, Yu e Li (2003) observaram que a expressão das proteínas RANKL em LCCG se dá principalmente em células mononucleares fusiformes enquanto o RANK em células mononucleares arredondadas e CGM. De acordo com esses autores, o processo de reabsorção óssea que acontece na LCCG é o mesmo que ocorre em tecido ósseo saudável, ou seja, pela ligação RANK-RANKL. Acredita-se que as CGM são originadas através da fusão de precursores mononucleares da linhagem

macrofágica/monocítica e que a OPG pode ser utilizada como agente terapêutico para evitar a reabsorção óssea em LCCG (ITONAGA et al., 2003; LIU; YU; LI, 2003).

Figura 3. Esquema da reabsorção óssea em tecido ósseo normal



Tóbon-Arroyave et al. (2005) investigaram a proteína RANK em LCCG e verificaram que essa proteína é expressa por CGM, CMO e células endoteliais. No entanto, as células fusiformes não apresentaram expressão dessa molécula. Diante disto sugerem que o tratamento medicamentoso da LCCG seja direcionado à inibição da reabsorção óssea nessa lesão.

Estudos sobre o microambiente de TCG de ossos não gnáticos que investigaram atividade da linhagem de células osteoblásticas mostram que CMO do tumor podem ser de origem osteoblástica e que, nestas lesões, quando ativadas podem diferenciar em osteoblastos e produzir osso (HUANG et al., 2004; MURATA et al., 2005; STEENSMA et al., 2013). Já o excesso na produção de RANKL favorece a osteólise causada pelas CGM da lesão (STEENSMA et al., 2013).

Park et al. (1995), investigando a proteína OC em tumores ósseos, verificaram pouca ou nenhuma marcação dessa proteína nas células gigantes de

TCG. Elias et al. (2010), estudando marcadores para remodelação óssea em tumores e lesões relacionadas ao osso, verificaram que as LCCG apresentavam alta expressão das proteínas RANK e RANKL no estroma e baixa expressão de OC quando comparada com outras lesões. Além disso, a expressão de RANKL em CGM em LCCG estava aumentada, sugerindo que esses resultados podem estar relacionados ao comportamento agressivo e osteolítico da LCCG.

Em síntese, a LCCG é uma lesão de natureza benigna, idiopática e que pode ter um comportamento agressivo. A investigação do papel dos receptores de glicocorticoide e de calcitonina e os seus resultados poderão contribuir para fortalecer a utilização de medicamentos à base de glicocorticoides e calcitonina para tratamentos não cirúrgicos em lesões extensas e de comportamento agressivo. Outro ponto importante é entender o processo de neoformação óssea pela investigação da expressão da proteína OC em LCCG, cujos resultados poderão contribuir para o melhor entendimento do processo de reparo nas lesões que possuam expressão dos receptores de glicocorticoide e calcitonina.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a expressão dos receptores de calcitonina e glicocorticoide, bem como da proteína osteocalcina em Lesão Central de Células Gigantes agressivas e não agressivas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar comparativamente a expressão desses receptores, glicocorticoide e calcitonina e da proteína osteocalcina em lesões agressivas e não agressivas.

Corelacionar a expressão de osteocalcina com os receptores de glicocorticoides e calcitonina nos dois grupos de LCCG.

Investigar se há diferença no número de células gigantes multinucleadas e de mitose nas células mononucleares nas lesões agressivas e não agressivas.

5 HIPÓTESE

Lesões não agressivas apresentam uma maior expressão de receptores da calcitonina, glicocorticoide e também de osteocalcina, além do maior número de células gigantes multinucleadas e de mitoses em células mononucleares.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Para este estudo foram selecionadas 33 amostras de LCCG do arquivo de blocos do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO/UFG). Os critérios de inclusão foram: blocos de pacientes bem preservados que apresentaram lesões intraorais primárias de LCCG confirmados pelo diagnóstico microscópico e através da investigação de dados clínicos que não receberam nenhuma terapêutica prévia com substâncias químicas. Além disso, os prontuários adequadamente preenchidos e blocos com quantidade de tecido suficiente para análise e com imagens radiográficas possíveis de se analisar (imagens que foram adquiridas com técnica adequada e com ausência de dobras, manchas e artefatos que impossibilitavam a análise). Os casos que não atenderam aos critérios acima foram excluídos da amostra. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás – protocolo No. 556.175/2014 (Anexo 1).

Os dados clínico-demográficos foram coletados a partir dos prontuários constantes dos prontuários contendo: idade, gênero, localização, tempo de evolução, sintomatologia e sinal clínico (tumefação). Os achados radiográficos observados nas imagens constantes nos prontuários foram o envolvimento dentário, 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. As características radiográficas associadas aos dados clínicos contribuíram para classificação das lesões em agressivas e não agressivas, de acordo com critérios estabelecidos por Chuong et al. (1986). Lesões que apresentavam sintomatologia, crescimento rápido, rompimento da cortical óssea, reabsorção e deslocamento dentários e alta taxa de recorrência após curetagem foram classificadas como agressivas. Lesões assintomáticas, de crescimento lento, com ausência de rompimento ou reabsorção das corticais ósseas e baixa taxa de recorrência foram classificadas como lesões não agressivas. Crescimento rápido foi considerado quando no prontuário havia relato do paciente que a lesão tinha tempo de evolução igual ou inferior a seis meses. Alta taxa de recorrência foi considerado quando a lesão recorria, ao menos uma vez, dentro de um período de 24 meses

após a terapia inicial [esse tempo é um período médio encontrado para recorrência encontrado no estudo de Chuong et al. (1986)]. As lesões foram classificadas pelo pesquisador responsável.

Após análise dos dados clínicos e radiográficos, dois casos de Tumor Marrom do Hiperparatireoidismo foram excluídos do estudo. De acordo com os critérios de Chuong et al. (1986), vinte lesões foram consideradas não agressivas e onze lesões agressivas (quadro 7).

Quadro 7. Resumo dos casos estudados.

Caso	Sexo	Idade (anos)	Localização	Sintomatologia	Evolução (meses)	Corticais Ósseas	Reabsorção e/ou Mobilidade	Recidiva (após curetagem)	Classificação (Chuong et al. 1986)
1	M	8	Maxila	Ausente	8	Expansão	-	Ausente	Não Agressiva
2	F	9	Mandíbula	Ausente	24	Preservadas	-	Ausente	Não Agressiva
3	F	9	Maxila	Ausente	24	Expandidas	-	Ausente	Não Agressiva
4	F	13	Mandíbula	Ausente	24	Preservadas	-	Ausente	Não Agressiva
5	M	16	Mandíbula	Ausente	10	Preservadas	-	Ausente	Não Agressiva
6	M	74	Maxila	Ausente	NI*	Preservadas	-	Ausente	Não Agressiva
7	F	52	Maxila	Ausente	30	Preservadas	-	Ausente	Não Agressiva
8	M	12	Mandíbula	Ausente	4	Expandidas	-	Ausente	Não Agressiva
9	F	62	Maxila	Ausente	NI*	Preservadas	-	Ausente	Não Agressiva
10	M	10	Maxila	Ausente	NI*	Expandidas	-	Ausente	Não Agressiva
11	M	69	Mandíbula	Ausente	NI*	Preservadas	-	Ausente	Não Agressiva
12	F	26	Mandíbula	Ausente	NI*	Preservadas	-	Ausente	Não Agressiva
13	F	50	Maxila	Ausente	13	Preservadas	-	Ausente	Não Agressiva
14	M	10	Maxila	Ausente	6	Preservadas	-	Ausente	Não Agressiva
15	F	47	Mandíbula	Ausente	6	Preservadas	-	Ausente	Não Agressiva
16	F	NI*	Mandíbula	Ausente	NI*	Preservadas	-	Ausente	Não Agressiva
17	F	NI*	Mandíbula	Ausente	6	Expandidas	-	Ausente	Não Agressiva
18	F	18	Mandíbula	Ausente	6	Preservadas	-	Ausente	Não Agressiva

Quadro 7. Resumo dos casos estudados (continuação).

Caso	Sexo	Idade (anos)	Localização	Sintomatologia	Evolução (meses)	Corticais Ósseas	Reabsorção e/ou Mobilidade	Recidiva (após curetagem)	Classificação (Chuong et al. 1986)
19	M	11	Maxila	Ausente	24	Expandidas	-	Ausente	Não Agressiva
20	F	62	Mandíbula	Ausente	12	Preservadas	-	Ausente	Não Agressiva
21	M	24	Mandíbula	Presente	8	Rompidas	Sim	Ausente	Agressiva
22	M	9	Mandíbula	Presente	NI*	Rompidas	Sim	Ausente	Agressiva
23	F	16	Mandíbula	Presente	2	Rompidas	Sim	3 recidivas	Agressiva
24	F	NI*	Mandíbula	Presente	2	Rompidas	Sim	Ausente	Agressiva
25	F	12	Mandíbula	Ausente	3	Rompidas	Sim	Ausente	Agressiva
26	F	13	Mandíbula	Presente	48	Rompidas	Sim	Ausente	Agressiva
27	F	8	Maxila	Presente	6	Rompidas	Sim	Ausente	Agressiva
28	M	65	Mandíbula	Ausente	NI*	Rompidas	Sim	Ausente	Agressiva
29	F	15	Maxila	Presente	2	Rompidas	Sim	1 recidiva	Agressiva
30	M	30	Mandíbula	Presente	6	Expandidas	Sim	Ausente	Agressiva
31	M	36	Mandíbula	Presente	NI*	Rompidas	Sim	Ausente	Agressiva

M – masculino; F – feminino; *NI – Não Informado.

6.2 TÉCNICA DA HEMATOXILINA E EOSINA

Para análise qualitativa da amostra foi empregada a técnica de rotina (Hematoxilina e Eosina): As amostras selecionadas foram seccionadas em micrótomo (Leica RM2165, Boston Laboratory Equipment, Heidelberg, Alemanha), obtendo-se de cada bloco cortes de 5 μ m, colocados sobre lâminas histológicas e coradas que possibilitaram a caracterização microscópica das amostras e confirmação do diagnóstico. Foram quantificados em dez campos consecutivos no aumento de 400x: o número médio de células gigantes multinucleadas e o número de mitoses em células mononucleares. As células foram consideradas em mitose quando se apresentavam nas fases de prófase, metáfase, anáfase ou telófase. Células com três ou mais núcleos foram consideradas CGM.

6.3 TÉCNICA DA IMUNOHISTOQUÍMICA

Esta avaliação foi realizada utilizando as amostras confirmadas pela análise qualitativa para avaliação dos RGC, RCT e da proteína OC.

Foram obtidos cortes seriados com aproximadamente 3 μ m de espessura montados em lâminas silanizadas, em seguida desparafinados e reidratados. Os cortes foram incubados em tampão citrato (pH = 6,0) durante 25 minutos e em seguida incubados com bloqueador de peroxidase (Easy LinkOne, EasyPath, São Paulo, Brasil). Os cortes foram então incubados com os anticorpos primários anti-RGC, anti-RCT e anti-OC (quadro 8) a 4°C durante *overnight*. Após esta etapa, os espécimes foram tratados com o método de polímeros-HRP (Easy LinkOne, EasyPath, São Paulo, Brasil), incubados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Easy LinkOne, EasyPath, São Paulo, Brasil) e contracolorados com hematoxilina de Mayers. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por solução tampão. Tonsila palatina humana, tireoide humana e rim humano foram utilizados como controle positivo para os anticorpos anti-RGC, anti-RCT e anti-OC, respectivamente.

Avaliação qualitativa das células imunomarcadas consistiu na análise do local de marcação (nuclear, citoplasmática ou de membrana) e também na intensidade de marcação em fraca, moderada e forte, com base na marcação dos controles positivos.

Na avaliação quantitativa, foram investigadas as células imunomarcadas com os anticorpos anti-RGC, anti-RCT e anti-OC, diferenciando as células mononucleares das células gigantes.

O número de células coradas e o total de células foram avaliados em oito campos microscópicos consecutivos no aumento original de 400x em microscópio óptico de luz, utilizando um retículo de integração quadrado, com uma área de 0,0961mm² (474068000000-Netzmikrometer x 12.5; Carl Zeiss, Alemanha). A proporção de células marcadas foi avaliada segundo escores propostos por Tobón-Arroyave et al. (2005): escore 0, sem células marcadas; 1, <25% das células marcadas; 2, 25-50% das células marcadas; ou 3, >50% das células marcadas. Um escore de intensidade da distribuição de marcação (IDS) foi calculado para cada amostra da seguinte maneira: a proporção de células marcadas em cada campo, multiplicada pela intensidade de marcação daquele mesmo campo, a média dos oito campos foi o IDS utilizado. A intensidade de marcação foi avaliada como: 0 – ausente; 1 – fraca; 2 – moderada; e 3 – forte, tomando como base a intensidade de marcação do controle positivo da amostra.

Quadro 8. Anticorpos utilizados para estudo imunohistoquímico.

Anticorpo	Fabricante	Diluição/Exposição	Controle positivo	Tempo no DAB
anti-Receptor de Glicocorticoide (BuGR2)	Abcam, Cambridge, Reino Unido	1:100 (citrate)	Tonsila palatina humana	3 minutos
Anti-Receptor de Calcitonina	Abcam, Cambridge, Reino Unido	1:100 (citrate)	Tireoide humana	3 minutos
Anti-Osteocalcina (FL100, sc30044)	Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA	1:50 (sem exposição)	Rim humano	1 minuto

6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade na distribuição das variáveis, verificando-se a distribuição não normal. O teste não paramétrico de Mann Whitney foi utilizado para a realização dos testes de comparação e o teste de correlação de Spearman para verificar possíveis associações entre os receptores e a proteína OC. Diferenças estatisticamente significantes foram fixadas quando $p < 0,05$. Os testes foram aplicados utilizando o software SPSS 20 para Windows (IBM Corp, Armonk, NY, EUA) e os resultados expressos com média e desvio padrão.

7 PUBLICAÇÃO

Artigo a ser submetido no periódico: **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology** (Normas no Anexo 2)

TITLE: Osteocalcin, Glucocorticoid and Calcitonin receptors expression in aggressive and non-aggressive Central Giant Cell Lesion

Allisson Filipe Lopes Martins^a, DDS; Paulo Otávio do Carmo Souza^b, DDS; Inara Costa Carneiro Rege^c, DDS, MSc; Marília Oliveira Moraes^d, DDS, MSc, Elismauro Francisco Mendonça^e, DDS, MSc, PhD.

^aOral Pathology, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil, allissonfilipe@hotmail.com;

^bOral Pathology, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil, paulotaviocs@gmail.com;

^cProfessor of Oral Radiology, Universidade Paulista (UNIP), Goiânia, GO, Brazil, inara.rege@uol.com.br;

^dOral Pathology, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil, mmorais.odonto@gmail.com;

^eProfessor of Oral Pathology, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil, elismaur@odonto.ufg.br

Correspondent author.

Prof. Elismauro Francisco Mendonça

Department of Stomatologic Sciences, Federal University of Goiás, Praça Universitária s/n, Setor Universitário, CEP 74605-220, Goiânia, GO, Brazil.

Phone number: +55 62 3209 6327

E-mail address: elismaur@ufg.br

There is no conflict of interest.

There is no any financial support for development of this research.

WORD COUNT

Abstract: 149 words

Comple Manuscript: 3,525 words

Number of References: 45

Number of Figures: 4

Number of Tables: 3

ABSTRACT

Objective: To evaluate the expression of glucocorticoid receptor (GR), calcitonin receptor (CTR) and osteocalcin (OC) in aggressive and nonaggressive Central Giant Cell Lesion (CGCL). The number of mitosis and multinucleated giant cells were also evaluated. **Study design:** Thirty-one cases of CGCL were submitted to immunohistochemistry. Mitotic figures and multinucleated giant cells were assessed through histochemical analyses. **Results:** Positive staining for GR, CTR and OC was observed in all of the cases studied. No differences between the variants of CGCL regarding the GR, CTR and OC expression were observed, although a higher OC expression in mononuclear cells was seen in the non-aggressive group. The aggressive group showed a higher number of multinucleated giant cells when compared to the non-aggressive ($p < 0.05$). **Conclusions:** Non-aggressive and aggressive CGCL can not be distinguished by the OC, CTR or GR expression, although the number multinucleated giant cells may help differentiate the forms of CGCL.

Keywords: Glucocorticoid receptor; calcitonin receptor; osteocalcin; central giant cell lesion

INTRODUCTION

The central giant-cell lesion of the jaws (CGCL) is a benign intraosseous lesion, and its true nature, if consist in a neoplastic or a reactive lesion, needs to be clarified.¹⁻⁴

Based on clinical and radiographic findings, the CGCL may be classified as either non-aggressive or aggressive. The aggressive lesions are associated with pain, rapid growth, cortical perforation, root resorption, and tendency to recur after surgical treatment, while the nonaggressive lesions cause little or no pain, grow slowly, and there is no cortical perforation or root resorption.^{2, 5-7} Aggressive lesions may also present a higher number multinucleated giant cells.⁷⁻⁹ The analysis of the number of mitotic figures of the mononuclear cells helps to distinguish the aggressive and non-aggressive CGCL^{7, 9}; however, some studies have shown that the lesions cannot be distinguished by the number of cells in proliferation.^{5, 10}

The classical treatment of CGCL may result in aesthetical and functional defects, and thus surgical procedures are undesirable in some cases, including in children and young adults.^{11, 12} Different treatments have been suggested, such as the use of intralesional glucocorticoids, calcitonin, and interferon alfa.^{6, 13-17} The use of these agents was based on clinical observations and due to the resemblances of CGCL with others lesions.^{2, 3, 16} It is believed that the glucocorticoid inhibits bone resorption by inducing osteoclasts apoptosis, reducing the production of proteases and suppress the inflammatory and angiogenic components of the CGCL.^{6, 12, 17, 18} The calcitonin may inhibit the multinucleated giant cell motility and the DNA synthesis of mononuclear cells in the CGCL.^{19, 20} According to the literature, the results of the therapeutic treatment of CGCL are variable and hard to predict.^{13-17; 21-28}

In order to justify the treatment of CGCL with glucocorticoids and calcitonin, some studies have investigated the presence of the glucocorticoid receptor (GR) and calcitonin receptor (CTR) in the cells of the lesion. Tobón-Arroyave et al.²⁹ were the first to investigate these receptors in aggressive and non-aggressive CGCL, evidencing that aggressive lesions express higher CTR. Additionally, Vered, Buncher, and Dayan⁴ found that all CGCL cases expressed GR, but the CTR was not expressed in all the lesions. Finally, Nogueira et al.² showed that there is no difference between the clinical variants of the lesion for the calcitonin and GR. Although there are studies about the GR and CTR expression in CGCL, there is no agreement whether the expression of these receptors are different in the variants of CGCL.

Another alternative treatment suggested is the use of proteins that act in bone remodeling.^{6, 30} Studies have demonstrated that the bone resorption process in CGCL is similar to that occurring in normal bone tissue.³¹⁻³³

The bone resorption process in CGCL is well documented in the literature³¹⁻³³; however, only a few studies evaluated the osteogenic profile and bone formation capacity of this lesion.^{33, 34} Osteocalcin (OC) is a protein secreted by osteoblasts that can be used as a marker of bone formation and osteoblastic activity.³⁵ The CGCL express little or do not express this protein,^{33, 34} but a comparative evaluation between the CGCL variants has not been made. The investigation of OC in non-aggressive and aggressive lesions may provide new information referent to the bone repair process, differential diagnosis between aggressive and non-aggressive lesions, and new treatment approaches.

The present study evaluated and compared the GR, CTR, and OC expressions in aggressive and non-aggressive CGCL. Furthermore, the number of mitoses in mononuclear cells and the number of multinucleated giant cells were evaluated in both groups of lesions and verified their influence in the biological behaviour of this lesion. This investigation may help elucidate if there is any difference between aggressive and non-aggressive CGCL regarding the expression of GR⁺, CTR⁺, and OC⁺, providing evidence that strengthens the use of alternative treatment instead of surgical procedure, such as the prescription of intralesional glucocorticoid and calcitonin to CGCL.

MATERIAL AND METHODS

Sample

For this study, 31 cases of primary CGCL, formalin-fixed paraffin-embedded materials were selected from the archives of the Oral Pathology Laboratory of the Oral Pathology Department, Dental School of Federal University of Goiás. The inclusion criteria were: well preserved paraffin-embedded blocks of patients with primary CGCL that did not receive prior treatment, confirmed assessing the microscopic and clinical data; records properly filled; blocks with sufficient tissue for analysis; and cases with radiographic images that have a high quality (images acquired with the standard technique, and without stains, folds and artifacts that make the analysis impossible). The cases that did not meet these criteria were excluded from the sample; cases of brown tumour of hyperparathyroidism and cherubism were also excluded.

The clinical and radiological data were retrieved from patients' records. Review of the specimens and clinical data were assessed to confirm the CGCL diagnosis. These

data were used to classify the lesions, based on criteria established by Chuong et al.⁵, into non-aggressive (n= 20), lesions with little or no symptoms, no evidence of cortical bone or root resorption or teeth displacement, slow growth and low recurrence rate, or aggressive lesions (n=11), characterized by pain, root resorption, teeth displacement, cortical bone perforation, rapid growth, and high rate of recurrence. A rapid growth rate was characterized when an asymmetry due to the lesions enlargement could be seen before 12 months of evolution. A high rate of recurrence was set when at least one recurrence happened before 24 months after the previous treatment (this time is an average observed by Chuong et al⁵). Patients were followed-up from 12 to 84 months. This research was approved by the Institutional Review Board of the Federal University of Goiás (UFG: no. 556.175/2014).

Immunohistochemical staining

The GR, CTR, and OC expressions were assessed through immunohistochemical staining. For the staining procedure, 3µm sections were coated with 2% 3-aminopropyltriethylsilane (Sigma Chemicals, St Louis, MO), deparaffinised, and hydrated. The sections were incubated in a citrate buffer (pH= 6.0) for 25 minutes (this step was excluded for the antibody anti-osteocalcin) and then incubated with peroxidase blocker (EasyLink One, EasyPath, Brazil). Sections were blocked through incubation with goat serum (Easy LinkOne, EasyPath, Sao Paulo, Brazil) and incubated with the primary mouse and rabbit antibodies: anti-Glucocorticoid receptor (BuGR2, ab2768, Abcam), anti-calcitonin receptor (ab140778, Abcam) diluted 1:100, and anti-osteocalcin (FL-100, sc30044; Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:50 at 4°C overnight. After this, the sections were treated using the HRP-polymer method (EasyLink One, EasyPath, Sao Paulo, Brazil) and incubated in 3.3'-

diaminobenzedine (Easy Link One, EasyPath, Sao Paulo, Brazil) for 3 minutes for glucocorticoid and CTR antibody and for 1 minute for OC antibody. Finally, the sections were counterstained with Mayers hematoxylin.

For positive control, human kidney tissue was used for OC antibody, human thyroid tissue for CTR and human tonsil tissue for GR. Negative controls were obtained by the omission of the primary antibody and the use of rabbit or goat serum instead.

GR, CTR, and OC analysis

The staining analysis was assessed by taking into consideration the number of positive and negative cells in the samples and was based on the method of Tobón-Arroyave et al.²⁹ The quantitative analysis was evaluated in eight high-power fields of each case in 400x magnification using an integration graticule (4740680000000-Netzmikrometer x 12.5; Carl Zeiss, Germany). The mononuclear and the multinucleated giant cells were evaluated separately.

The number of stained cells was divided by the total number of cells in each field; a percentage of the mean in the eight high-power fields was used as the estimation for the expression in each case. The proportion of stained cells was then classified in scores as 0, no stained cells; 1, <25% stained cells; 2, 25-50% stained cells; or 3, >50% stained cells.

The qualitative analysis of the immunohistochemical staining was assessed to determine if the staining was in the cell nucleus, cytoplasm, or cytoplasmic membrane. Additionally, the staining intensity in each field was evaluated, comparing to the control sample and classified as 0= no staining; 1 = weak staining; 2= moderate staining; and 3= intense staining. Furthermore, a staining-intensity-distribution (SID) score was calculated by multiplication of the score of the proportion

of stained cells and the score of the staining intensity in each field. The mean of the eight fields was used as the SID score for that case.

Mitotic figures and multinucleated giant cells

The number mitotic figures in mononuclear cells and the number of multinucleated giant cells (cells with 3 or more nuclei) and were assessed through investigation of slides stained with hematoxylin and eosin (HE). The slides were evaluated in 10 consecutive fields in 400x magnification using an integration graticule (4740680000000-Netzmikrometer x 12.5; Carl Zeiss, Germany) in a light microscope.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the IBM SPSS Statistics Software 20.0 for Windows. The non-parametric Mann-Whitney test was used to compare the proportion of stained cells and the SID score between the clinical variants of CGCL. The Spearman's correlation coefficient was used to verify correlations. Statistical significance was set when $p < 0.05$. The results are expressed as median (minimum and maximum values).

RESULTS

Sample analysis

The sample analysis of all cases showed a predominance of female patients (58%) with a mean age of 28 years (minimum of 8 years old and maximum of 74). The mandible was the most common affected site (61.3%). The clinical and radiographic features of the cases studied classified as non-aggressive and aggressive are summarized in Table 1.

GR analysis

Positive immunohistochemical reactivity for GR was detected in cell nuclei of mononuclear and multinucleated giant cells in all cases analyzed (Figure 1). In the non-aggressive group, 50% of the cases had a high GR expression (percentage of the positive cells higher than the median number of the positive cells in all cases studied) in mononuclear or multinucleated giant cells. In the aggressive group, 54% of the lesions had a high expression of this receptor.

The percentage of positive mononuclear component was 33.21% in the non-aggressive group and 44.09% in the aggressive group ($p=0.312$). For the multinucleated giant cells, the expression of positive cells was 61.44% in the non-aggressive group and 67.5% in the aggressive group ($p=0.901$).

The SID score analysis in mononuclear cells was 3 in the non-aggressive group and 6 in the aggressive group ($p=0.411$). In the multinucleated giant cells, the SID score was 3 in the non-aggressive group and 5.02 in the aggressive group ($p=0.659$). Data of GR expression are summarised in Tables 2 and 3.

CTR analysis

The immunoreactivity for CTR was detected in the cytoplasm and cytoplasmic membrane of mononuclear and multinucleated giant cells in 100% of the cases studied (Figure 2). A high CTR expression in mononuclear was observed in 50% of the cases in the non-aggressive group and in 55.54% in the aggressive group. For the CTR expression in multinucleated giant cells, a high expression was observed in 55% of the non-aggressive lesions and in 45.45% of the aggressive lesions.

In the mononuclear component, the percentage of cells positive for calcitonin was 34.12% in the non-aggressive group and 32.27% in the aggressive group ($p=0.836$). The expression of CTR in multinucleated giant cells was 65.74% in non-aggressive and 62.8% in aggressive CGCL ($p=0.967$).

The SID score for the mononuclear component was 4.69 for the non-aggressive group and 4.68 for the aggressive group ($p=0.612$) (Table 2). In the multinucleated giant cells, the score was 2.62 in the non-aggressive group and 3.43 in the aggressive group ($p=0.265$) (Table 3).

OC analysis

The immunoreactivity for OC was scarce in the cytoplasm of mononuclear and multinucleated giant cells (Figure 3). However, in the mononuclear component a higher staining intensity was seen when compared to the multinucleated giant cells. The OC expression in mononuclear cells was high in 55% of the non-aggressive cases and 45.45% in the aggressive lesions. A high OC expression in the giant cells was observed in 45% of the non-aggressive lesions and 63.63% of the aggressive cases.

The mononuclear cells in the non-aggressive lesions showed higher OC expression (5.35%) when compared with the aggressive forms (3.43%), although this difference was not statistically significant ($p=0.409$). In the multinucleated giant cells, the percentage of positive cells in the non-aggressive group was 4.76% and 8.39% in the aggressive group ($p=0.519$).

The SID score in mononuclear component was 1.56 in the non-aggressive group and 1.62 in the aggressive group ($p=0.725$). Regarding the SID score in multinucleated giant cells, the non-aggressive group presented a score of 0.375 and the aggressive

group 0.875; however, no statistical significance was observed ($p=0.299$). Tables 2 and 3 summarize the OC analysis in mononuclear and multinucleated giant cells, respectively.

Mitotic figures and number of multinucleated giant cells

The number of mitotic figures in 10 high power field was 6 (range, 0 – 18) in the non-aggressive group and 1.0 (range, 4 – 18) in the aggressive group ($p=0.262$). The aggressive group showed a higher number of multinucleated giant cells (median = 7.4, minimum = 3.6; maximum = 14.5) when compared with the aggressive group (median = 4.6, minimum = 1.2; maximum = 11) ($p=0.01$).

Correlation tests

A significant correlation between the CTR expression in mononuclear and in multinucleated giant cells could be observed ($r= 0.45$; $p<0.01$) (Figure 4A).

Concerning the different groups, the non-aggressive group showed a significant correlation between the CTR expression in the mononuclear and in multinucleated giant cells ($r=0.66$; $p<0.01$) (Figure 4B). For the aggressive group, a significant correlation was only observed between the OC and CTR expression in multinucleated giant cells ($r=0.718$; $p=0.01$) (Figure 4C).

DISCUSSION

Our results demonstrate that there is no difference between the GR and CTR expression either in aggressive or non-aggressive CGCL. The OC expression was higher in the mononuclear component of the non-aggressive form; however, statistical significance was not found. These findings suggest that the GR, CTR, and OC expressions in the mononuclear or in the multinucleated giant cells cannot

distinguish the aggressive and non-aggressive forms of CGCL. Since both kinds of CGCL have the same cell lineage, their aggressiveness can be related to other factors, such as the stromal vascular density of lesions^{36,37} or the production of matrix metalloproteinases.³⁸

The diversity in the results of the CGCL alternative treatments has encouraged investigations about the GR and CTR expression.^{2, 4, 29, 39} Two of these studies evaluated in a comparative way the non-aggressive and aggressive variants.^{2, 29} Tobón-Arroyave et al.²⁹ investigated the receptors expression in 27 cases of non-aggressive lesions and 10 cases of aggressive lesions. The authors find a significant difference in the CTR expression. However, the mononuclear and multinucleated giant cells were not evaluated in a distinct mode as in our study. The literature shows that the mononuclear component is the cells in proliferation,^{9, 10} while the multinucleated giant cells are the responsible for bone resorption.^{19, 31, 32} Thus, the glucocorticoid and calcitonin have different mechanisms of action in these cells.^{12, 20} An investigation including these kinds of cells is important to help understand the appropriate mechanism of action of the drug in the tissue when therapeutic protocol is used.

Nogueira et al.² also studied the GR and CTR expression in mononuclear and multinucleated giant cells in 18 cases of non-aggressive and aggressive lesions, and like ours results, they did not find any differences in the receptors expression in the two forms of CGCL in both mononuclear and in the multinucleated giant cells components.

Therapies with calcitonin and glucocorticoids of the CGCL have been described in the literature, and the results of these therapies vary from the complete resolution up

to lesion enlargement.^{12, 13,15-17; 21-28} Nogueira et al.² showed that lesions with moderate or good response to intralesional glucocorticoids injection showed a higher expression of GR prior to the treatment. This variety in GR expression may explain why some lesions have a good response, while others have a negative response to the use of intralesional glucocorticoid.

Although there are reports about the successful use of calcitonin,^{15,18, 39} failure in this treatment may be related to its prolonged use, which can cause an escape phenomenon diminishing the CTR expression.^{39,40} Due to absence of a unique protocol establishing the dose to be prescribed for each patient, we believe that more studies with either success or failure will be described in the literature.

In our study, the expressions of the receptors were investigated only in formalin-fixed paraffin-embedded material of CGCL prior to the treatment, and our results together with results of previous studies^{2, 4, 29, 39} suggest that either aggressive or non-aggressive cases of CGCL can be treated with intralesional glucocorticoids and/or spray or subcutaneous injection of calcitonin. These therapies can exclude surgical procedures and contribute to reduction of cicatritial bone defects.

Immunohistochemical study of these receptors can be helpful before making the decision of the better protocol treatment to be applied.

To the best of our knowledge, this is the first study to investigate OC in non-aggressive and aggressive CGCL. The OC expression can be used to determine the level of osteoblast activity and bone formation.³⁵ We believe that the OC expression in mononuclear cells of the CGCL may be a reflex of the intra-osseous nature of the lesion or an attempt to produce bone against a resorption stimulus. Additionally, the

positive expression of the OC in cells of the CGCL stroma may indicate that at least some cells have bone producing potential.

In this study, we found little expression of OC in non-aggressive and aggressive cases of CGCL. Park et al.³⁴ and Elias et al.³³ described the same expression pattern in previous studies, although these authors did not use the aggressiveness classification. The reduced expression of OC in cells of CGCL may be related to the high osteolytic potential of the lesion. The excessive production of proteins related to bone resorption in the stroma of CGCL³³ may suppress the OC production or the maturation of the osteoblastic cell, thus diminishing its expression favouring the bone resorption process.

Based on our results, we speculate that a lesser expression of OC in mononuclear cells in the aggressive group can reflect in larger lesions with a higher potential to reabsorb bone including the cortical plate. Associated with this, it is described that aggressive lesions may present a higher number of multinucleated giant cells than non-aggressive lesions⁷⁻⁹; this finding was also observed in our study. It is hypothesised that MGC are osteoclastic cells formed by mononuclear cell fusion.^{31, 32} Corroborating with this hypothesis, we observed a positive correlation between the CTR expression in mononuclear and in multinucleated giant cells that may indicate that the giant cells are formed by the fusion of mononuclear cells expressing CTR, since this receptor is a marker that indicates an osteoclastic cell lineage.⁴¹

Previous studies suggest that stromal cells of giant cell tumour of bone (GCTB) also express little or do not express OC.^{42, 43} In a study conducted by Steensma et al.⁴³ with cell culture of fresh samples of the GCTB, it was observed that these cells, when cultured in an osteogenic media, enhanced the OC expression, suggesting that the

GCTB have an osteoblastic cell lineage that may initiate a bone mineralisation process. Due to the similarities described in the literature of the GCTB and CGCL^{44,}⁴⁵ and based on our results, we believe that stromal cells, when stimulated by the presence of agents that can act in bone remodeling, will enhance the OC expression, and thus an osteogenic process will start. This therapeutic target can be an alternative treatment of CGCL.

The number of mitosis has been related to the CGCL aggressiveness. Some authors have demonstrated that aggressive lesions have a higher number of mitotic figures.⁷⁻

⁹ However, in our study we did not find differences in the number of mitosis in aggressive and non-aggressive lesions. This difference may be due to different methodologies applied; while we investigated the number of mitotic figures in 10 high-power fields, the other authors investigated in 25 high-power fields.

Corroborating with our findings, O'Malley¹⁰ investigated the cell proliferation in CGCL, using the Ki-67 protein and analysing the positive cells in 10 fields, did not find a difference between the two forms.

Our results provide new information about the bone repair capacity in CGCL through the investigation of OC. The reduced expression of OC found in our study may be due to the osteolytic behaviour of the lesion. We believe that OC⁺ cells may promote a bone repair process when stimulated with osteogenic agents. Due to the limited number of cases and bone repair marker evaluated, more studies with more cases and different proteins related to bone formation should be conducted to assess the role of the osteogenic cells in CGCL, and also to provide evidences that justify treatments that can induce bone repair through the activation of the OC⁺ cells. In summary, our findings support that the positive expression of GR and CTR in CGCL can contribute to the choice of alternative treatment with intralesional glucocorticoids

and calcitonin of CGCL, either in aggressive or non-aggressive lesions. This kind of therapy may reduce or avoid the defects caused by the surgical treatment of the lesion.

CONCLUSIONS

The GR, CTR, and OC expressions do not differentiate the non-aggressive and aggressive forms of CGCL; however, the number of multinucleated giant cells may be helpful in distinguishing these kinds of lesions.

REFERENCES

1. R.L. Nogueira, M.H Faria, R.L. Osterne, R.B., Cavalcante, R.A. Ribeiro, C.F. Nonaka, et al., Central giant cell lesion of the jaws: study of CCND1 gene amplification and p16INK4a protein levels, *J Mol Histol.* 44 (2013) 527-534.
2. R.L. Nogueira, M.H.G. Faria, R.L.V. Osterne, R.B., Cavalcante, R.A. Ribeiro, S.H.B. Rabenhorst. Glucocorticoid and calcitonin receptor expression in central giant cell lesions: implications for therapy, *Int J Oral Maxillofac Surg.* 41 (2012) 994-1000.
3. J.A. Regezi, M.A. Pogrel, Comments on the pathogenesis and medical treatment of central giant cell granulomas, *J Oral Maxillofac Surg.* 62 (2004) 116-118.
4. M. Vered, A. Buchner, D. Dayan, Immunohistochemical expression of glucocorticoid and calcitonin receptors as a tool for selecting therapeutic approach in central giant cell granuloma of the jawbones, *Int J Oral Maxillofac Surg.* 35 (2006) 756-760.
5. R. Chuong, L.B. Kaban, H. Kozakewich, A. Perez-Atayde, Central giant cell lesions of the jaws: a clinicopathologic study, *J Oral Maxillofac Surg.* 44 (1986) 708-713.
6. J. de Lange, H.P. van den Akker, H. van den Berg, Central giant cell granuloma of the jaw: a review of the literature with emphasis on therapy options, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 104 (2007) 603-615.
7. V. Reddy, S. Saxena, P. Aggarwal, P. Sharma, M. Reddy, Incidence of central giant cell granuloma of the jaws with clinical and histological confirmation: an archival study in Northern India, *Br J Oral Maxillofac Surg.* 50 (2012) 668-672.
8. G. Ficarra, L.B. Kaban, L.S. Hansen, Central giant cell lesions of the mandible and maxilla: a clinicopathologic and cytometric study, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 64 (1987) 44-49.
9. B. Kruse-Losler, R. Diallo, C. Gaertner, K.L. Mischke, U. Joss, J. Kleinheinz, Central giant cell granuloma of the jaws: a clinical, radiologic, and histopathologic study of 26 cases, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 101 (2006) 346-354.

10. M. O'Malley, M.A. Pogrel, J.C. Stewart, R.G. Silva, J.A. Regezi, Central giant cell granulomas of the jaws: phenotype and proliferation-associated markers, *J Oral Pathol Med.* 26 (1997) 159-163.
11. M.A. Rawashdeh, A.B. Bataineh, T. Al-Khateeb, Long-term clinical and radiological outcomes of surgical management of central giant cell granuloma of the maxilla, *Int J Oral Maxillofac Surg.* 35 (2006) 60-66.
12. R.L. Nogueira, R.C. Teixeira, R.B. Cavalcante, R.A., Ribeiro, S.H. Rabenhosrt, Intralesional injection of triamcinolone hexacetonide as an alternative treatment for central giant-cell granuloma in 21 cases, *Int J Oral Maxillofac Surg.* 39 (2010) 1204-1210.
13. D.M. Allon, Y. Anavi, S. Calderon, Central giant cell lesion of the jaw: nonsurgical treatment with calcitonin nasal spray, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 107 (2009) 811-818.
14. J. De Lange, H.P. Van den Akker, Clinical and radiological features of central giant-cell lesions of the jaw, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 99 (2005) 464-470.
15. H.O. Borges, R.A. Machado, M.M Vidor, R.G. Beltrão, C. Heitz, M.S. Filho, Calcitonin: a non-invasive giant cells therapy, *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 72 (2008) 959-963.
16. L.B. Kaban, J.B Mulliken, R.A. Ezekowitz, D. Ebb, P.S. Smith, J. Folkman, Antiangiogenic therapy of a recurrent giant cell tumor of the mandible with interferon alfa-2a, *Pediatrics.* 103 (1999) 1145-1149.
17. R. Carlos, H.O. Sedano, Intralesional corticosteroids as an alternative treatment for central giant cell granuloma, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 93 (2002) 161-166.
18. M.A. Pogrel, Calcitonin therapy for central giant cell granuloma, *J Oral Maxillofac Surg.* 61 (2003) 649-653; discussion 653-644.

19. A.M. Flanagan, B. Nui, S.M. Tinkler, M.A. Horton, D.M. Williams, T.J. Chambers, The multinucleate cells in giant cell granulomas of the jaw are osteoclasts, *Cancer*. 62 (1988) 1139-1145.
20. J. de Lange, A.J. Rosenberg, H.P. van den Akker, R. Koole, J.J. Wirts, H. van den Berg, Treatment of central giant cell granuloma of the jaw with calcitonin, *Int J Oral Maxillofac Surg*. 28 (1999) 372-376.
21. N.G. da Silva, A.S. Carreira, E.N. Pedreira, F.M. Tuji, K.L. Ortega, J. de Jesus Viana Pinheiro. Treatment of central giant cell lesions using bisphosphonates with intralesional corticosteroid injections, *Head Face Med*. 8 (2012) 23.
22. I. Rubio-Correa, D. Manzano-Solo de Zaldívar, R. González-García, L. Ruíz-Laza, L. Villanueva-Alcojol, D. González-Ballester, et al., Giant cell granuloma of the maxilla. Global management, review of literature and case report, *J Clin Exp Dent*. 4 (2012) e129-131.
23. M.B. da Silva Sampieri, R.Y. Yaedú, P.S. Santos, E.S. Gonçalves, E. Santa'ana, A. Consolaro, et al., Central giant cell granuloma: treatment with calcitonin, triamcinolone acetonide, and a cystic finding 3 years and 6 months after the primary treatment, *Oral Maxillofac Surg*. 17 (2013) 229-234.
24. J. de Lange, H.P. van den Akker, H. van den Berg, D.J. Richel, R.A. Gortzak, Limited regression of central giant cell granuloma by interferon alpha after failed calcitonin therapy: a report of 2 cases, *Int J Oral Maxillofac Surg*. 35 (2006) 865-869.
25. J. de Lange, H.P. van den Akker, G.O. Veldhuijzen van Zanten, H.A. Engelshove, H. van den Berg, H. Klip, Calcitonin therapy in central giant cell granuloma of the jaw: a randomized double-blind placebo-controlled study, *Int J Oral Maxillofac Surg*. 35 (2006) 791-795.
26. J. de Lange, R.R. van Rijn, H. van den Berg, H.P. van den Akker, Regression of central giant cell granuloma by a combination of imatinib and interferon: a case report, *Br J Oral Maxillofac Surg*. 47 (2009) 59-61.
27. K.E. Goldman, M.K. Marshall, E. Alessandrini, M.L. Bernstein, Complications of alpha-interferon therapy for aggressive central giant cell lesion of the maxilla, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 100 (2005) 285-291.

28. P. Schutz, K.H El-Bassuoni, J. Munish, H.H Hamed, B.L. Padwa, Aggressive central giant cell granuloma of the mandible, *J Oral Maxillofac Surg.* 68 (2010) 2537-2544.
29. S.I. Tobon-Arroyave, L.M Franco-González, D.M Isaza-Guzmán, G.A. Floréz-Moreno. T. Bravo-Vásquez, D.A. Castañeda-Peláez, et al, Immunohistochemical expression of RANK, GRalpha and CTR in central giant cell granuloma of the jaws, *Oral Oncol.* 41 (2005) 480-488.
30. W.H. Schreuder, A.W Coumou, P.A. Kessler, J. de Lange., Alternative Pharmacologic Therapy for Aggressive Central Giant Cell Granuloma: Denosumab, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 72 (2014) 1301-1309.
31. B. Liu, S.F. Yu, T.J. Li, Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts, *J Oral Pathol Med.* 32 (2003) 367-375.
32. I. Itonaga, I. Hussein, O. Kudo, A. Sabokbar, S. Watt-Smith, D. Ferguson, et al., Cellular mechanisms of osteoclast formation and lacunar resorption in giant cell granuloma of the jaw, *J Oral Pathol Med.* 32 (2003) 224-231.
33. L.S. Elias, R.F. Costa, M.A. Carvalho, A.C. Batista, T.A. Silva, C.R. Leles, et al., Markers of bone remodeling in neoplastic and bone-related lesions, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 110 (2010) 624-631.
34. Y.K. Park, M.H. Yang, Y.W. Kim, H.R. Park, Osteocalcin expression in primary bone tumors--in situ hybridization and immunohistochemical study, *J Korean Med Sci.* 10 (1995) 263-268.
35. M.S. Razzaque, Osteocalcin: a pivotal mediator or an innocent bystander in energy metabolism?, *Nephrol Dial Transplant.* 26 (2011) 42-45.
36. N.C. Dewsnup, S.M. Susaria, M. Abulikemu, W.C. Faquin, L.B. Kaban, M. August, Immunohistochemical Evaluation of Giant Cell Tumors of the Jaws Using CD34 Density Analysis, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 66 (2008) 928-933.

37. Z.S. Peacock, R.C. Jordan, B.L. Schmidt, Giant cell lesions of the jaws: does the level of vascularity and angiogenesis correlate with behavior?, *J Oral Maxillofac Surg.* 70 (2012) 1860-1866.
38. S.I. Tobón-Aroyave, S.M. Mideros-Simarra, L.M. Castaño-Ramírez, G.A. Flórez-Moreno, D.M. Isaza-Guzmán. Overexpression of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and -9 in central giant cell lesions of the jaws: implications for clinical behavior. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 110 (2010) 755-763.
39. M. Vered, I Shohat, A. Buncher, D. Dayan, S. Taicher., Calcitonin nasal spray for treatment of central giant cell granuloma: clinical, radiological, and histological findings and immunohistochemical expression of calcitonin and glucocorticoid receptors, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 104 (2007) 226-239.
40. M. Pondel, Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond, *Int J Exp Pathol.* 81 (2000) 405-422.
41. J.M. Quinn, M. Morfis, M.H. Lam, J. Elliott, V. Kartsogiannis, E.D. Williams et al. Calcitonin receptor antibodies in the identification of osteoclasts, *Bone* (1999) 1-8.
42. L. Huang, X.Y. Teng, Y.Y. Cheng, K.M. Lee, S.M. Kumta, Expression of preosteoblast markers and Cbfa-1 and Osterix gene transcripts in stromal tumour cells of giant cell tumour of bone, *Bone.* 34 (2004) 393-401.
43. M.R. Steensma, W.K. Tyler, A.G. Shaber, S.R. Goldring, F.P. Ross, B.O. Williams, et al., Targeting the giant cell tumor stromal cell: functional characterization and a novel therapeutic strategy, *PLoS One.* 8 (2013) e69101.
44. B. Kashyap, S.P. Reddy, R. Desai, R.S. Puranik, S.S. Vanaki, Computer assisted histomorphologic comparison and the expression of AgNORs in the central and peripheral giant cell lesions of the oral cavity and giant cell tumor of the long bone, *J Oral Maxillofac Pathol.* 18 (2014) S54-59.
45. C.M. Resnick, J. Margolis, S.M. Susaria, J.H. Schwab, F.J. Hornicek, T.B. Dodson, et al., Maxillofacial and axial/appendicular giant cell lesions: unique tumors or variants of the same disease?--A comparison of phenotypic, clinical, and radiographic characteristics, *J Oral Maxillofac Surg.* 68 (2010) 130-137.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Immunohistochemistry staining showing positive mononuclear (asterisk arrow) and multinucleated giant cells (black arrow) for glucocorticoid receptor. Non-aggressive lesion (A), SID mononuclear cells = 6; SID multinucleated giant cells = 9. Aggressive lesion (B), SID mononuclear cells = 6; SID multinucleated giant cells = 7.5 (immunohistochemical staining, original magnification 400x).

Figure 2. Immunohistochemistry staining showing positive mononuclear (asterisk) and multinucleated giant cells (black arrow) for calcitonin receptor. Non-aggressive lesion (A), SID mononuclear cells = 7.125; SID multinucleated giant cells = 6.375. Aggressive lesion (B), SID mononuclear cells = 3.4; SID multinucleated giant cells = 3.6 (immunohistochemical staining, original magnification 400x).

Figure 3. Immunohistochemistry staining showing positive mononuclear (asterisk) and negative multinucleated giant cells (black arrow) for osteocalcin. The arrow head shows a woven bone showing positive staining for OC. Non-aggressive lesion (A), SID mononuclear cells = 1; SID multinucleated giant cells = 0,125 and aggressive lesion (B), SID mononuclear cells = 1.25; SID multinucleated giant cells = 0 (immunohistochemical staining, original magnification 400x).

Figure 4. Correlations graphs. Correlation between CTR expression in mononuclear cells (MOC) and multinucleated giant cells (MGC) in CGCL (n=31; $r=0.45$, $p<0.01$, Spearman's correlation test) (A); Graphic of the correlation between the CTR expression in mononuclear (MOC) and multinucleated giant cells (MGC) in the non-aggressive group of CGCL (n=20; $r=0.66$; $p<0.01$, Spearman's correlation test) (B). Correlation between the CTR and OC expression in multinucleated giant cells (MGC) in the aggressive group (n=11, $r=0.718$; $p=0.01$, Spearman's correlation test) (C).

Table 1. Clinical features of the cases studied

	CGCL	Non-Aggressive	Aggressive
	(n=31)	(n=20)	(n=11)
Mean age (years)	28.07	31	22.8
Sex			
Female	58% (18)	60% (12)	54.5% (6)
Male	42% (13)	40% (8)	45.5% (5)
Site			
Mandible	61.3% (19)	55% (11)	72.7% (8)
Maxilla	38.7% (12)	45% (9)	27.3% (3)
Symptoms			
Yes	29% (9)	0% (0)	81.1% (9)
No	71% (22)	100% (20)	18.9% (2)
Evolution			
(mean in months)	12.4	14	9.6
Cortical bone			
Preserved	67.75% (21)	100% (20)	9.1% (1)
Perforation	32.25% (10)	0% (0)	90.9% (10)
Teeth displacement or resorption	35.48% (11)	0% (0)	100% (11)
Treatment			
Surgical	100% (31)	100% (20)	100% (11)
Additional Treatment	-	-	27.27% ^a (3)
Recurrence	9.67% (3)	-	27.27% (3)

^aThe two additional treatment were treated with pharmacological approach. One case was treated with calcitonin nasal spray. The other recurrent case was treated with corticosteroids together with calcitonin nasal spray.

Table 2. CTR, GR and OC expression and SID score in mononuclear cells, results are expressed as median (minimum and maximum values).

	Non-Aggressive (n=20)	Aggressive (n=11)	P value^a
GR Expression	33.21 (5.53 – 100)	45.09 (15.62 – 78.08)	0.312
CTR Expression	34.12 (1.43 – 61.25)	32.27 (14.90 – 43.8)	0.836
OC Expression	5.84 (0 – 28.8)	3.43 (0.61 – 23.57)	0.409
GR SID score	3 (1 – 9)	6 (1 – 9)	0.411
CTR SID score	4.69 (0.375 – 8.250)	4.68 (1.875 – 6.5)	0.612
OC SID score	1.56 (0 – 8,25)	1.625 (0.625 – 3.5)	0.725

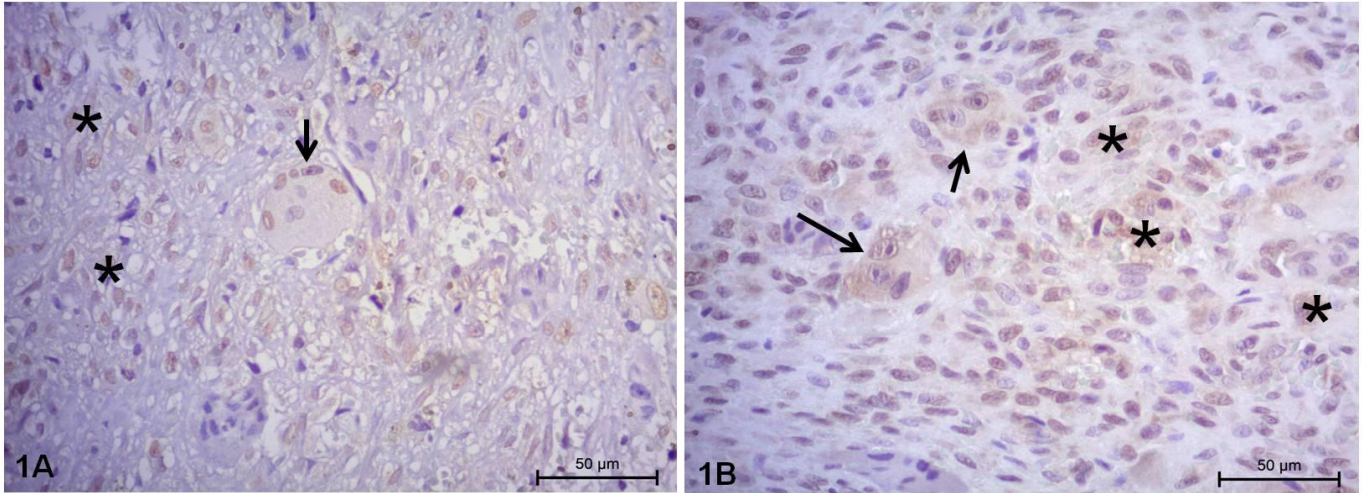
^aMann Whitney test.

Table 3. CTR, GR and OC expression and SID score in multinucleated giant cell results are expressed as median (minimum and maximum values).

	Non-Aggressive (n=20)	Aggressive (n=11)	P value^a
GR Expression (%)	61.44 (16 – 100)	67.5 (15 – 95.14)	0.901
CTR Expression (%)	65.74 (8.77 – 100)	62.80 (4.6 – 96.8)	0.967
OC Expression (%)	4.76 (0 – 30.45)	8.39 (0 – 47.05)	0.519
GR SID score	3 (1 – 9)	5.02 (1 – 8.25)	0.659
CTR SID score	2.62 (0.375 – 6.375)	3.43 (0.125 – 6.375)	0.262
OC SID score	0.375 (0 – 6.375)	0.875 (0 – 5.875)	0.299

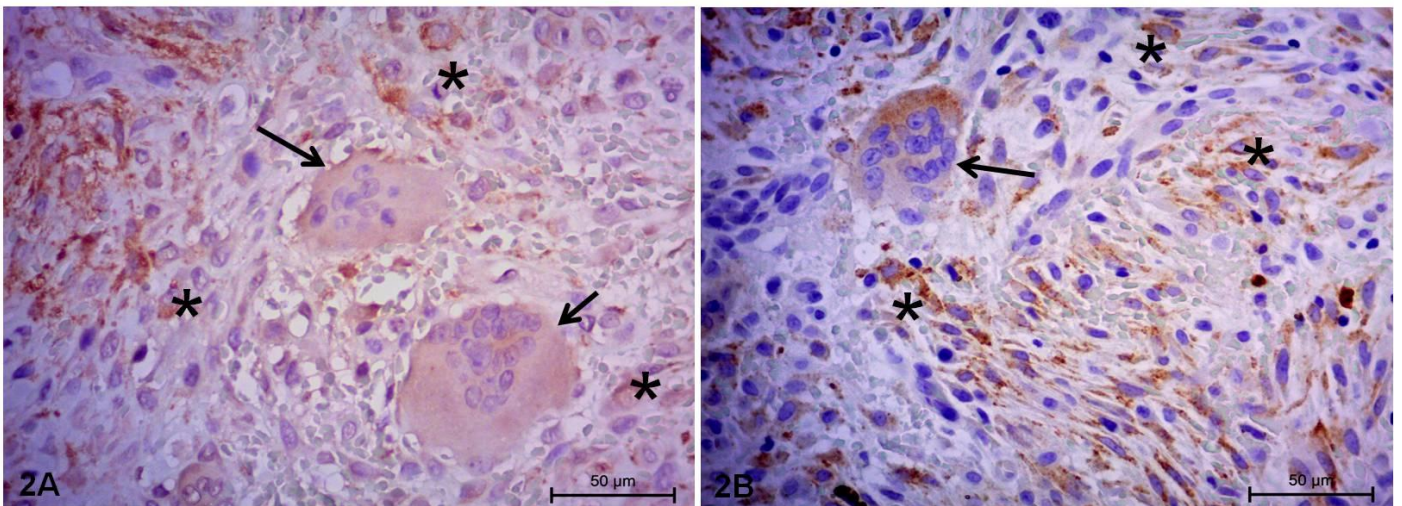
^aMann Whitney test.

Figure 1. Immunohistochemistry staining of GR in non-aggressive (A) and aggressive (B) CGCL.



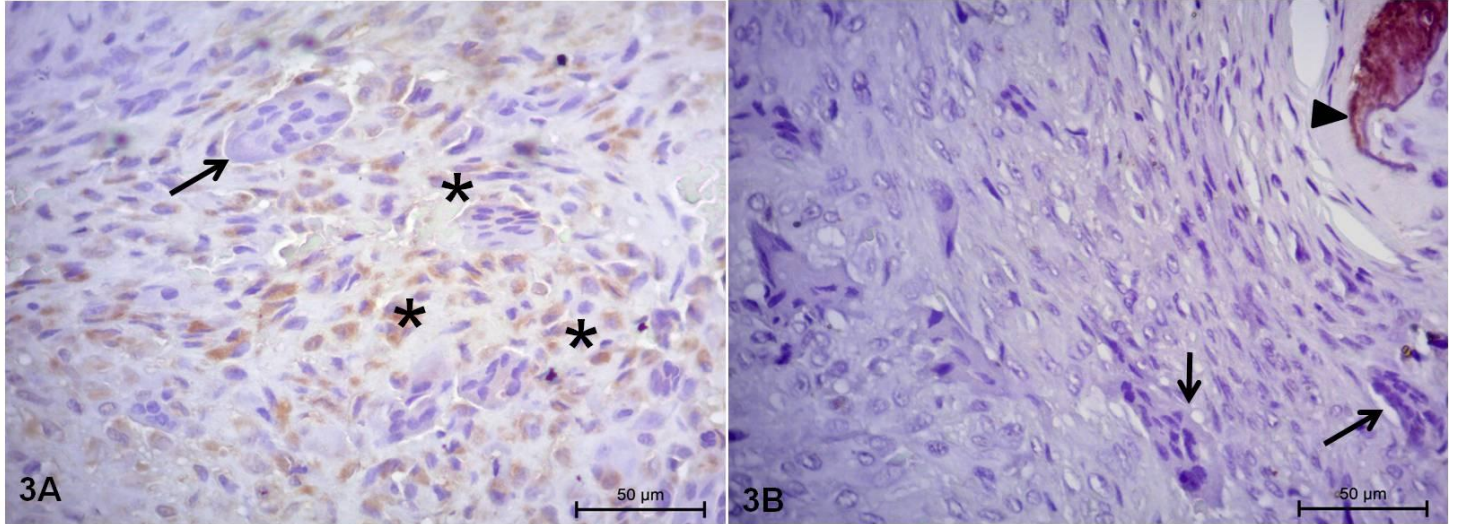
Immunohistochemistry staining showing positive mononuclear (asterisk) and multinucleated giant cells (black arrow) for glucocorticoid receptor. Non-aggressive (A) and aggressive lesion (B), 400x.

Figure 2. Immunohistochemistry staining of CTR in non-aggressive (A) and aggressive (B) CGCL.



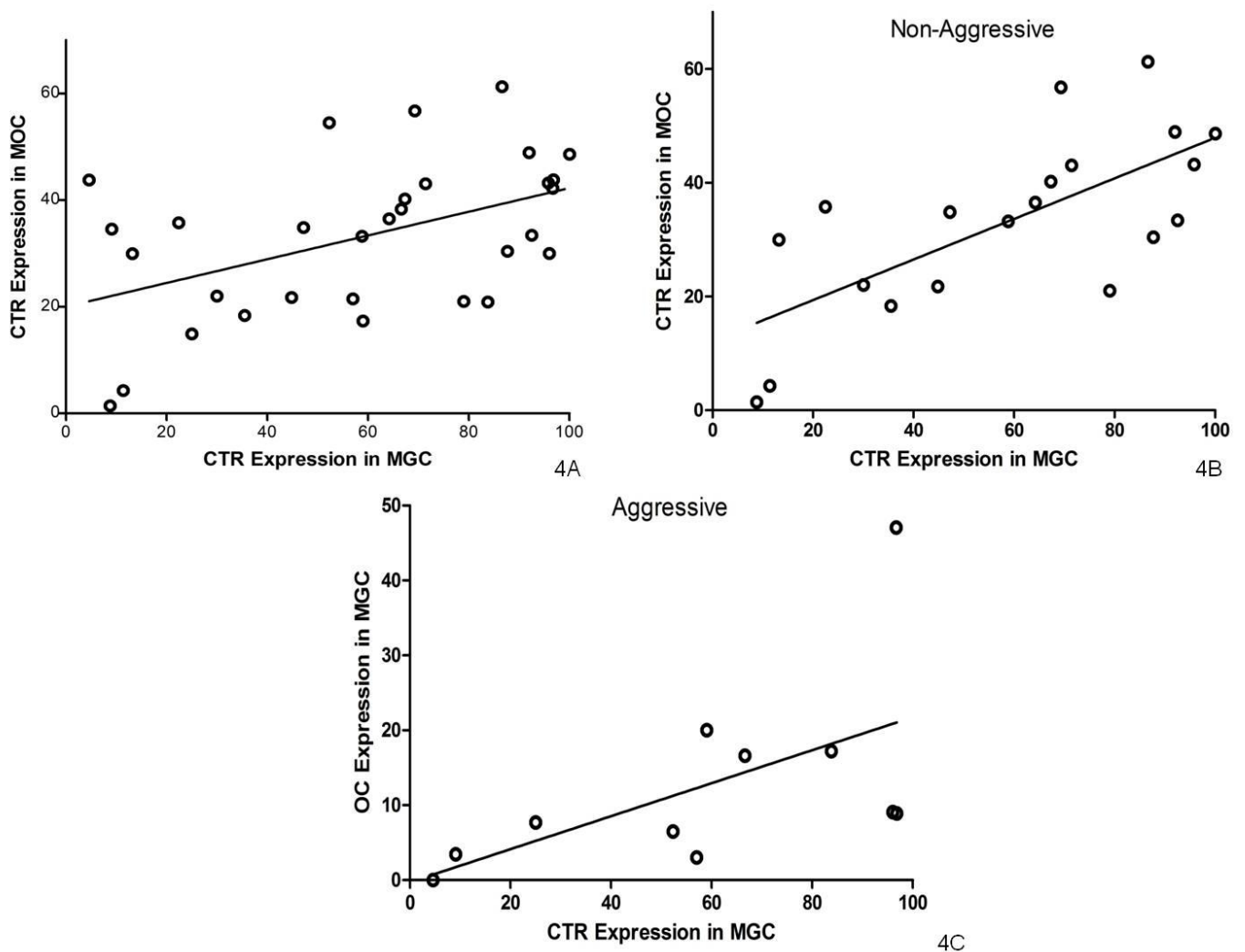
Immunohistochemistry staining showing positive mononuclear (black arrow) and multinucleated giant cells (black arrow) for calcitonin receptor. Non-aggressive (A) and aggressive lesion (B), 400x.

Figure 3. Immunohistochemistry staining of OC in non-aggressive (A) and aggressive (B) CGCL.



Immunohistochemistry staining showing positive mononuclear (asterisk) and negative multinucleated giant cells (black arrow) for osteocalcin. The arrow head shows a woven bone showing positive staining for OC, non-aggressive(A) and aggressive lesion (B), 400x.

Figure 4. Correlations graphs. Correlation between CTR expression in mononuclear cells (MOC) and multinucleated giant cells (MGC) in CGCL (n=31; $r= 0.45$, $p<0,01$, Spearman's Correlation Test) (A); Graphic of the correlation between the CTR expression in mononuclear (MOC) and multinucleated giant cells (MGC) in the non-aggressive group of CGCL (n=20; $r=0.66$; $p<0.01$, Spearman's Correlation Test) (B). Correlation between the CTR and OC expression in multinucleated giant cells (MGC) in the aggressive group (n=11, $r=0.718$; $p=0.01$, Spearman's correlation test) (C).



8 CONCLUSÕES

O conhecimento gerado a partir dessa investigação auxilia a responder dúvidas presentes na literatura quanto à diferença na expressão do RGC e RCT em LCCG agressivas e não agressivas. Nossos resultados demonstram que todos os casos estudados expressam os receptores e que não existem diferenças quanto à expressão desses receptores em lesões não agressivas e agressivas. Adicionalmente, nossos achados fortalecem o uso de tratamentos alternativos para a LCCG como injeções intralesionais de glicocorticoide e calcitonina, independente da sua agressividade.

Este foi o primeiro trabalho a analisar comparativamente marcadores da linhagem osteoblástica em LCCG não agressiva e agressiva. O marcador de escolha foi a OC e os resultados demonstraram que a linhagem osteoblástica está presente na lesão. Apesar de não terem sido encontradas diferenças quanto à expressão da OC nas diferentes formas da lesão, sugere-se uma maior expressão dessa proteína em lesões não agressivas, o que pode refletir em um comportamento osteolítico menor.

Nossos resultados sugerem que as células gigantes dessa lesão são formadas através da fusão de algumas células mononucleares. Além disso, os achados apontam que as CGM são responsáveis pela reabsorção óssea na LCCG.

As lesões agressivas apresentam mais CGM do que as lesões não agressivas e esse pode ser um parâmetro auxiliar no diagnóstico microscópico diferencial das variantes da LCCG.

Por fim, o estudo apresentou algumas limitações como o fato de somente uma técnica e um marcador terem sido utilizados para estudo da linhagem osteoblástica e um pequeno número de casos agressivos. Mais estudos com diferentes marcadores, maior número de casos e técnicas que complementem o nosso estudo devem ser realizados a fim de auxiliar na compreensão do papel dessa linhagem celular na LCCG e para o desenvolvimento de novas terapias que promovam a formação óssea a partir da ativação da linhagem osteoblástica.

9 REFERÊNCIAS

ABDO, E. N. et al. Treatment of a central giant cell granuloma with intralesional corticosteroid. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 43, n. 1, p. 74-6, 2005.

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. **J Oral Pathol**, v. 3, n. 5, p. 217-23, 1974.

ADORNATO, M. C.; PATICOFF, K. A. Intralesional corticosteroid injection for treatment of central giant-cell granuloma. **J Am Dent Assoc**, v. 132, n. 2, p. 186-90, 2001.

AGARAM, N. P. et al. USP6 gene rearrangements occur preferentially in giant cell reparative granulomas of the hands and feet but not in gnathic location. **Human Pathol**, v. 45, n. 6, p. 1147-52, 2014.

ALLON, D. M.; ANAVI, Y.; CALDERON, S. Central giant cell lesion of the jaw: nonsurgical treatment with calcitonin nasal spray. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 107, n. 6, p. 811-8, 2009.

AMARAL, F. R. et al. Quantitative expression analysis of apoptotic/antiapoptotic genes and association with immunolocalization of BAX and BCL-2 in peripheral and central giant cell lesions of the jaws. **Tumour Biol**, v. 32, n. 5, p. 997-1003, 2011.

AMARAL, F. R. et al. NFATc1 and TNFalpha expression in giant cell lesions of the jaws. **J Oral Pathol Med**, v. 39, n. 3, p. 269-74, 2010.

ARAGAO, M. S. et al. Central giant cell granuloma of the jaws and giant cell tumor of long bones: an immunohistochemical comparative study. **J Appl Oral Sci**, v. 15, n. 4, p. 310-6, 2007.

ARORA, S. S. et al. Secondary jaw aneurysmal bone cyst (JABC) – a possible misnomer? A review of literature on secondary JABCs, their pathogenesis and oncogenesis. **J Oral Pathol Med**, v. 43, p. 647-51, 2014.

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

AZUMA, K. et al. Glucocorticoid-induced gene tripartite motif-containing 63 (TRIM63) promotes differentiation of osteoblastic cells. **Endocrine Journal**, v. 57, n. 5, p. 455-462, 2010.

BAKER, S. B. et al. Aggressive central giant cell lesion of the maxilla: surgical management and the use of adjuvant interferon alfa-2a. **Plast Reconstr Surg**, v. 122, n. 2, p. 77e-9e, 2008.

BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. Pathology and genetics of head and neck tumours. In: KLEIHUES, P. e SOBIN, L. H. (Ed.). **World Health Organization classification of tumours**. Lyon, France, 2005. p. 430.

BECKER, D. E. Basic and clinical pharmacology of glucocorticosteroids. **Anesth Prog**, v. 60, n. 1, p. 25-31; quiz 32, 2013.

BERTI, S. A. et al. Spontaneous Resolution of a Central Giant-Cell Granuloma After Incisional Biopsy: A Case Report. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 67, n. 7, p. 1543-1547, 2009.

BORGES, H. O. et al. Calcitonin: a non-invasive giant cells therapy. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 72, n. 7, p. 959-63, 2008.

BURESH, C. J. et al. t(X;4)(q22;q31.3) in giant cell reparative granuloma. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 115, n. 1, p. 80-1, 1999.

CAFFORIO, P. et al. Functional expression of the calcitonin receptor by human T and B cells. **Hum Immunol**, v. 70, n. 9, p. 678-85, 2009.

CARINCI, F. et al. Genetic profiling of central giant cell granuloma of the jaws. **J Craniofac Surg**, v. 16, n. 3, p. 399-407, 2005.

CARLOS, R.; SEDANO, H. O. Intralesional corticosteroids as an alternative treatment for central giant cell granuloma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 93, n. 2, p. 161-6, 2002.

CARVALHO, V. M. et al. Novel mutations in the SH3BP2 gene associated with sporadic central giant cell lesions and cherubism. **Oral Dis**, v. 15, n. 1, p. 106-10, 2009.

CHIHARA, K. ; et al. Central nervous system effect of calcitonin: stimulation of prolactin release in rats. **Brain Res**, v. 248, n. 2, p. 331-9, 1982.

CHOI, J. W.; KRAUT, R. A. Management of central giant granuloma of mandible with intralesional triamcinolone injections: a case report. **N Y State Dent J**, v. 79, n. 3, p. 34-6, 2013.

CHUONG, R. et al. A. Central giant cell lesions of the jaws: a clinicopathologic study. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 44, n. 9, p. 708-13, 1986.

COLLINS, A. Experience with anti-angiogenic therapy of giant cell granuloma of the facial bones. **Ann R Australas Coll Dent Surg**, v. 15, p. 170-5, 2000.

COMERT, E.; TURANLI, M.; ULU, S. Oral and intralesional steroid therapy in giant cell granuloma. **Acta Otolaryngol**, v. 126, n. 6, p. 664-6, 2006.

DA SILVA, N. G. et al. Treatment of central giant cell lesions using bisphosphonates with intralesional corticosteroid injections. **Head Face Med**, v. 8, p. 23, 2012.

DA SILVA SAMPIERI, M. B. et al. Central giant cell granuloma: treatment with calcitonin, triamcinolone acetonide, and a cystic finding 3 years and 6 months after the primary treatment. **Oral Maxillofac Surg**, v. 17, n. 3, p. 229-34, 2013.

DANIELS, J. S. Primary hyperparathyroidism presenting as palatal brown tumor. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 98, n. 4, p. 409-13, 2004.

DE CORSO, E. et al. Advanced giant cell reparative granuloma of the mandible: radiological features and surgical treatment. **Acta Otorhinolaryngol Ital**, v. 26, n. 3, p. 168-72, 2006.

DE LANGE, J. et al. Treatment of central giant cell granuloma of the jaw with calcitonin. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 28, n. 5, p. 372-6, 1999.

DE LANGE, J.; VAN DEN AKKER, H. P. Clinical and radiological features of central giant-cell lesions of the jaw. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 99, n. 4, p. 464-70, 2005.

DE LANGE, J.; VAN DEN AKKER, H. P.; KLIP, H. Incidence and disease-free survival after surgical therapy of central giant cell granulomas of the jaw in The Netherlands: 1990-1995. **Head Neck**, v. 26, n. 9, p. 792-5, 2004.

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 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 104, n. 5, p. 603-15, 2007a.

DE LANGE, J. et al. Limited regression of central giant cell granuloma by interferon alpha after failed calcitonin therapy: a report of 2 cases. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 35, n. 9, p. 865-9, 2006a.

DE LANGE, J. et al. Calcitonin therapy in central giant cell granuloma of the jaw: a randomized double-blind placebo-controlled study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 35, n. 9, p. 791-5, 2006b.

DE LANGE, J. et al. DNA analysis of the SH3BP2 gene in patients with aggressive central giant cell granuloma. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 45, n. 6, p. 499-500, 2007b.

DE LANGE, J. et al. Regression of central giant cell granuloma by a combination of imatinib and interferon: a case report. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 47, n. 1, p. 59-61, 2009.

DEWSNUP, N. C. et al. Immunohistochemical Evaluation of Giant Cell Tumors of the Jaws Using CD34 Density Analysis. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 66, n. 5, p. 928-933, 2008.

DOMINGUEZ, C. L. et al. Intranasal calcitonin therapy for central giant cell granuloma. **Journal of Craniomaxillofacial Surgery**, v. 32, p. 244-245, 2004.

EL HADIDI, Y.N.; GHANEM, A.A.; HELMY, I. Injection of steroids intralesional in central giant cell granuloma cases (giant cell tumor): Is it free of systemic complications or not? A case report. **Int J Surg Case Rep**, v. 8, p. 166-170, 2015.

ELIAS, L. S. et al. Markers of bone remodeling in neoplastic and bone-related lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 110, n. 5, p. 624-31, 2010.

ETEMADI, J. et al. Brown tumor of hyperparathyroidism masquerading as central giant cell granuloma in a renal transplant recipient: A case report. **Transplant Proc**, v. 41, n. 7, p. 2920-2, 2009.

FARRIER, S. L. et al. A 10-year review of the occurrence and treatment of central giant cell granulomas, in a District General Hospital. **J Oral Pathol Med**, v. 35, n. 6, p. 332-7, 2006.

FERRETTI, C.; MUTHRAY, E. Management of central giant cell granuloma of mandible using intralesional corticosteroids: case report and review of literature. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 69, n. 11, p. 2824-9, 2011.

- FICARRA, G.; KABAN, L. B.; HANSEN, L. S. Central giant cell lesions of the mandible and maxilla: a clinicopathologic and cytometric study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 64, n. 1, p. 44-9, 1987.
- FINDLAY, D. M.; SEXTON, P. M. Calcitonin. **Growth Factors**, v. 22, n. 4, p. 217-24, 2004.
- FLANAGAN, A. M. et al. The multinucleate cells in giant cell granulomas of the jaw are osteoclasts. **Cancer**, v. 62, n. 6, p. 1139-45, 1988.
- FONSECA, F. P. et al. Fine needle aspiration cytology and intralesional steroid injection in a central giant cell granuloma affecting the gingiva: a new clinical approach. **Braz Dent J**, v. 24, n. 4, p. 420-7, 2013.
- FRENDO, J. L. et al. Calcitonin receptor mRNA expression in TT cells: effect of dexamethasone. **Mol Cell Endocrinol**, v. 139, n. 1-2, p. 37-43, 1998.
- GANGIDI, S.; DYER, R.; CUNLIFFE, D. Not all radiolucencies of the jaw require enucleation: a case of brown tumor. **Br J oral Maxillofac Surg**, v. 50, n. 3, p. e33-5, 2012.
- GOLDMAN, K. E. et al. Complications of alpha-interferon therapy for aggressive central giant cell lesion of the maxilla. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 100, n. 3, p. 285-91, 2005.
- 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 jaw. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 118, p. 583-585, 2014.
- GRAHAM, R. M.; FOSTER, M. E.; RICHARDSON, D. An unusual presentation of a central giant cell granuloma and initial treatment with intralesional steroids – a case report and review of the literature. **J Oral Health Comm Dent**, v. 2, n. 3, p. 65-69, 2008.
- GUNEY, E. et al. Brown tumor of the maxilla associated with primary hyperparathyroidism. **Auris Nasus Larynx**, v. 28, n. 4, p. 369-72, 2001.
- HARRIS, M. Central giant cell granulomas of the jaws regress with calcitonin therapy. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 31, n. 2, p. 89-94, 1993.

HENRIQUES, A. C. G. et al. Clinical pathological analysis of nine cases of aneurysmal bone cyst of the jaws in a Brazilian population. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 269, n. 3, p. 971-7, 2012.

HUANG, L. et al. Expression of preosteoblast markers and Cbfa-1 and Osterix gene transcripts in stromal tumour cells of giant cell tumour of bone. **Bone**, v. 34, n. 3, p. 393-401, 2004.

IDOWU, B. D. et al. Mutations in SH3BP2, the cherubism gene, were not detected in central or peripheral giant cell tumours of the jaw. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 46, n. 3, p. 229-30, 2008.

ITONAGA, I. et al. Cellular mechanisms of osteoclast formation and lacunar resorption in giant cell granuloma of the jaw. **J Oral Pathol Med**, v. 32, n. 4, p. 224-31, 2003.

JOHANSSON, A. et al. Unstable translocation (8;22) in a case of giant cell reparative granuloma. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 177, n. 1, p. 59-63, 2007.

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. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 60, n. 10, p. 1103-11; discussion 1111-3, 2002.

KABAN, L. B. et al. Adjuvant antiangiogenic therapy for giant cell tumors of the jaws. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 65, n. 10, p. 2018-24; discussion 2024, 2007.

KERMER, C.; MILLESI, W.; WATZKE, I. M. Local injection of corticosteroids for central giant cell granuloma. A case report. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 23, n. 6 Pt 1, p. 366-8, 1994.

KHAFIF, A.; KREMPL, G.; MEDINA, J. E. Treatment of giant cell granuloma of the maxilla with intralesional injection of steroids. **Head Neck**, v. 22, n. 8, p. 822-5, 2000.

KOUGARS, G. E.; NIAMTU, J.; SVIRSKY, J. A. Cherubism: diagnosis, treatment, and comparison with central giant cell granulomas and giant cell tumors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 73, n. 3, p. 369-374, 1992.

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

KUROKAWA, M.; MICHELANGELI, V. P.; FINDLAY, D. M. Induction of calcitonin receptor expression by glucocorticoids in T47D human breast cancer cells. **J Endocrinol**, v. 130, n. 2, p. 321-6, 1991.

KURTZ, M.; MESA, M.; ALBERTO, P. Treatment of a central giant cell lesion of the mandible with intralesional glucocorticosteroids. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 91, n. 6, p. 636-7, 2001.

LACROIX, M.; SIWEK, B.; BODY, J. J. Breast cancer cell response to calcitonin: modulation by growth-regulating agents. **Eur J Pharmacol**, v. 344, n. 2-3, p. 279-86, 1998.

LIMA, G. M. G.; ALMEIDA, J. D.; CABRAL, L. A. G. Cherubism: clinicoradiographic features and treatment. **J Oral Maxillofac Res**, v. 1, n. 2 e2, 2010.

LIU, B.; YU, S. F.; LI, T. J. Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts. **J Oral Pathol Med**, v. 32, n. 6, p. 367-75, 2003.

LIU, C. et al. Structural and functional insights of RANKL-RANK interaction and signaling. **J Immunol**, v. 184, n. 12, p. 6910-9, 2010.

LU, L. et al. The epithelial sodium channel is involved in dexamethasone-induced osteoblast differentiation and mineralization. **Cell Biology and Toxicology**, v. 28, n. 5, p. 279-289, 2012.

LYRITIS, G. P.; TROVAS, G. Analgesic effects of calcitonin. **Bone**, v. 30, n. 5 Suppl, p. 71S-74S, 2002.

MA, X. et al. Dexamethasone induces osteogenesis via regulation of hedgehog signalling molecules in rat mesenchymal stem cells. **Int Orthop**, v. 37, n. 7, p. 1399-404, 2013.

MANOR, E.; KACHKO, L.; BRENNAN, P. A.; BODNER, L. Cytogenetics of central giant cell granuloma of the mandible. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 71, n. 9, p. 1541-4, 2013.

MATOS, F.R.; MORAES, M.; NONAKA, C.F.W.; SOUZA, L.B.; FREITAS, R. A. Immunoexpression of TNF- α and TGF- β in central and peripheral giant cell lesions of the jaws. **J Oral Pathol Med**, v.41, p. 194-199, 2012.

MENG, X. M.; YU, S. F.; YU, G. Y. Clinicopathologic study of 24 cases of cherubism. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 43, p. 350-356, 2005.

MOHANTY, S.; JHAMB, A. Central giant cell lesion of mandible managed by intralesional triamcinolone injections. A report of two cases and literature review. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 14, n. 2, p. E98-102, 2009.

MOTAMEDI, M. H. K. et al. Variable presentations of aneurysmal bone cysts of the jaws: 51 cases treated during a 30-year-period. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, n. 10, p. 2098-103, 2008.

MURATA, A. et al. Osteoblast lineage properties in giant cell tumors of bone. **J Orthop Sci**, v. 10, n. 6, p. 581-8, 2005.

NAOT, D.; CORNISH, J. The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. **Bone**, v. 43, n. 5, p. 813-8, 2008.

NICOLAI, G. et al. Central giant cell granuloma of the jaws. **J Craniofac Surg**, v. 21, n. 2, p. 383-6, 2010.

NICOLAIDES, N. C. et al. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. **Steroids**, v. 75, n. 1, p. 1-12, 2010.

NOGUEIRA, R. L. et al. Central giant cell lesion of the jaws: study of CCND1 gene amplification and p16INK4a protein levels. **J Mol Histol**, v. 44, n. 5, p. 527-34, 2013.

NOGUEIRA, R. L. et al. Glucocorticoid and calcitonin receptor expression in central giant cell lesions: implications for therapy. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 41, n. 8, p. 994-1000, 2012a.

NOGUEIRA, R. L. et al. Cyclooxygenase-2 expression in central giant cell lesion of the jaws: an immunohistochemical study. **J Mol Histol**, v. 43, n. 1, p. 59-62, 2012b.

NOGUEIRA, R. L. et al. Intralesional injection of triamcinolone hexacetonide as an alternative treatment for central giant-cell granuloma in 21 cases. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 39, n. 12, p. 1204-10, 2010.

O'CONNELL, J. E.; KEARNS, G. J. Aggressive giant cell granuloma of the jaws treated with interferon alpha: a report of two cases. **Ir J Med Sci**, v. 182, n. 2, p. 163-70, 2013.

O'MALLEY, M. et al. Central giant cell granulomas of the jaws: phenotype and proliferation-associated markers. **J Oral Pathol Med**, v. 26, n. 4, p. 159-63, 1997.

O'REGAN, E. M.; GIBB, D. H.; ODELL, E. W. Rapid growth of giant cell granuloma in pregnancy treated with calcitonin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 92, n. 5, p. 532-8, 2001.

OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. **J Allergy Clin Immunol**, v. 132, n. 5, p. 1033-44, 2013.

OLIVEIRA, A. M. et al. USP6 (TRE 2) fusion oncogenes in aneurysmal bone cyst. **Cancer Res**, v. 64, n. 6, p. 1920-3, 2004a.

OLIVEIRA, A. M. et al. USP6 and CDH11 oncogenes identify the neoplastic cell in primary aneurysmal bone cyst and are absent in the so called secondary aneurysmal bone cysts. **Am J Pathol**, v. 165, n. 5, p. 1773-80, 2004b.

OSTERNE, R. L. et al. Intralesional corticosteroid injections in the treatment of central giant cell lesions of the jaws: a meta-analytic study. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 18, n. 2, p. e226-32, 2013.

PAPADAKI, M. E. et al. Cherubism: best clinical practice. **Orphanet J Rare Dis**, v. 7, n. 1 s6, 2012.

PARK, Y. K. et al. Osteocalcin expression in primary bone tumors--in situ hybridization and immunohistochemical study. **J Korean Med Sci**, v. 10, n. 4, p. 263-8, 1995.

PEACOCK, Z. S.; JORDAN, R. C.; SCHMIDT, B. L. Giant cell lesions of the jaws: does the level of vascularity and angiogenesis correlate with behavior? **J Oral Maxillofac Surg**, v. 70, n. 8, p. 1860-6, 2012.

PEÑARROCHA, M. et al. Cherubism: a clinical, radiographic, and histopathologic comparison of 7 cases. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 64, p. 924-30, 2006.

PERROTTI, V. et al. Solid aneurysmal bone cyst of the mandible. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 68, n. 10, p. 1339-44, 2004.

PHILLIPS, J. E. et al. Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by Runx2/Cbfa1 serine phosphorylation. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 3, p. 581-91, 2006.

POGREL, M. A. Calcitonin therapy for central giant cell granuloma. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 61, n. 6, p. 649-53; discussion 53-4, 2003.

POGREL, M. A. et al. Calcitonin treatment for central giant cell granulomas of the mandible: report of two cases. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 57, n. 7, p. 848-53, 1999.

RACHMIEL, A. et al. Combined treatment of aggressive central giant cell granuloma in the lower jaw. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 40, n. 3, p. 292-7, 2012.

RAJEEVAN, N. S.; SOUMITHRAN, C. S. Intralesional corticosteroid injection for central giant cell granuloma. A case report. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 27, n. 4, p. 303-4, 1998.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 904 p.

RAWASHDEH, M. A.; BATAINEH, A. B.; AL-KHATEEB, T. Long-term clinical and radiological outcomes of surgical management of central giant cell granuloma of the maxilla. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 35, n. 1, p. 60-6, 2006.

RAZZAQUE, M. S. Osteocalcin: a pivotal mediator or an innocent bystander in energy metabolism? **Nephrol Dial Transplant**, v. 26, n. 1, p. 42-5, 2011.

REDDY, V. et al. Incidence of central giant cell granuloma of the jaws with clinical and histological confirmation: an archival study in Northern India. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 50, n. 7, p. 668-72, 2012.

REGEZI, J. A. Odontogenic cysts, odontogenic tumors, fibroosseous, and giant cell lesions of the jaws. **Mod Pathol**, v. 15, n. 3, p. 331-41, 2002.

REGEZI, J. A.; POGREL, M. A. Comments on the pathogenesis and medical treatment of central giant cell granulomas. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, n. 1, p. 116-8, 2004.

RESNICK, C. M. et al. Maxillofacial and axial/appendicular giant cell lesions: unique tumors or variants of the same disease?--A comparison of phenotypic, clinical, and radiographic characteristics. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 68, n. 1, p. 130-7, 2010.

ROBERTS, J.; SHORES, C.; ROSE, A. S. Surgical treatment is warranted in aggressive central giant cell granuloma: a report of 2 cases. **Ear Nose Throat J**, v. 88, n. 3, p. E8-E13, 2009.

ROMERO, M. et al. Orthopedic and orthodontic treatment in central giant cell granuloma treated with calcitonin. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 48, n. 5, p. 519-25, 2011.

RUBIO-CORREA, I. et al. Giant cell granuloma of the maxilla. Global management, review of literature and case report. **J Clin Exp Dent**, v. 4, n. 2, p. e129-31, 2012.

SARODE, S. C.; SARODE, G. S. Cellular cannibalism in central and peripheral giant cell granuloma of the oral cavity can predict biological behavior of the lesion. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 43, n. 6, p. 459-463, 2014.

SCHREUDER, W. H. et al. Alternative Pharmacologic Therapy for Aggressive Central Giant Cell Granuloma: Denosumab. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 7, p. 1301-1309, 2014.

SCHUTZ, P. et al. Aggressive central giant cell granuloma of the mandible. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 68, n. 10, p. 2537-44, 2010.

SEZER, B. et al. Intralesional corticosteroid injection for central giant cell granuloma: a case report and review of the literature. **Turk J Pediatr**, v. 47, n. 1, p. 75-81, 2005.

SHIRANI, G. et al. Management of a locally invasive central giant cell granuloma (CGCG) of mandible: report of an extraordinary large case. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 39, n. 7, p. 530-3, 2011.

SOUTER, M. A.; BIRD, P. A.; WORTHINGTON, J. P. Giant cell reparative granuloma of the temporal bone treated with calcitonin. **Otol Neurotol**, v. 27, n. 7, p. 999-1002, 2006.

STEENSMA, M. R. et al. Targeting the giant cell tumor stromal cell: functional characterization and a novel therapeutic strategy. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69101, 2013.

SUAREZ-ROA M, L. et al. Interventions for central giant cell granuloma (CGCG) of the jaws. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 4, p. CD007404, 2009.

SUN, Z. J. et al. Aneurysmal Bone Cysts of the Jaws: Analysis of 17 cases. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 68, n. 9, p. 2122-8, 2010.

SUN, Z. J. et al. Aneurysmal Bone Cysts of the Jaws. **Int J Surg Pathol**, v. 17, n.4, p. 311-22, 2009a.

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

TEIXEIRA, R. C. et al. SH3BP2-encoding exons involved in cherubism are not associated with central giant cell granuloma. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 40, n. 8, p. 851-5, 2011.

TERRY, B. C.; JACOWAY, J. R. Management of central giant cell lesions – an alternative to surgical therapy. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 26, n. 3, p. 579-600, 1994.

THEOLOGIE-LYGIDAKIS, N. et al. Treatment of central giant-cell granulomas of the jaws in children: conservative or radical surgical approach? **J Craniomaxillofac Surg**, v. 39, n. 8, p. 639-44, 2011.

TOBON-ARROYAVE, S. I. et al. Immunohistochemical expression of RANK, GR α and CTR in central giant cell granuloma of the jaws. **Oral Oncol**, v. 41, n. 5, p. 480-8, 2005.

TOBON-ARROYAVE, S. I. et al. Overexpression of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and -9 in central giant cell lesions of the jaws: implications for clinical behavior. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 110, n. 6, p. 755-63, 2010.

TORABINIA, N.; RAZAVI, S. M.; SHOKROLAHI, Z. A comparative immunohistochemical evaluation of CD68 and TRAP protein expression in central and peripheral giant cell granulomas of the jaws. **J Oral Pathol Med**, v. 40, n. 4, p. 334-7, 2011.

TOSCO, P. et al. Surgical treatment and reconstruction for central giant cell granuloma of the jaws: a review of 18 cases. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 37, n. 7, p. 380-7, 2009.

TRIANTAFILLIDOU, K. et al. Brown tumors of the jaws associated with primary or secondary hyperparathyroidism. A clinical study and review of literature. **Am J Otolaryngol**, v. 27, n. 4, p. 281-6, 2006.

TRIANTAFILLIDOU, K. et al. Central giant cell granuloma of the jaws: a clinical study of 17 cases and a review of the literature. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 120, n. 3, p. 167-74, 2011.

TROUVIN, A. P.; GOEB, V. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. **Clin Interv Aging**, v. 5, p. 345-54, 2010.

TSODOULOS, S. et al. Cherubism: a case report of a three-generation inheritance and literature review. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 72, n. 2, p. 405e1 – 405e2, 2014.

VERED, M.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. Immunohistochemical expression of glucocorticoid and calcitonin receptors as a tool for selecting therapeutic approach in central giant cell granuloma of the jawbones. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 35, n. 8, p. 756-60, 2006.

VERED, M. et al. Stromal myofibroblasts in central giant cell granuloma of the jaws cannot distinguish between non-aggressive and aggressive lesions. **J Oral Pathol Med**, v. 36, n. 8, p. 495-500, 2007a.

VERED, M. et al. Calcitonin nasal spray for treatment of central giant cell granuloma: clinical, radiological, and histological findings and immunohistochemical expression of calcitonin and glucocorticoid receptors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 104, n. 2, p. 226-39, 2007b.

VERGEL DE DIOS, A. M. et al. Aneurysmal bone cyst. A clinicopathologic study of 238 cases. **Cancer**, v. 69, n. 12, p. 2921-31, 1992.

VIEIRA, R. D. R. et al. Total Spontaneous Regression of a Central Giant Cell Granuloma After Incisional Biopsy: A Four-Year Follow-Up Case Report. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 4, p. 730-736, 2014.

WENDT, F. P. et al. Intralesional corticosteroid injection for central giant cell granuloma: an alternative treatment for children. **J Dent Child (Chic)**, v. 76, n. 3, p. 229-32, 2009.

WHITAKER, S. B.; WALDRON, C. A. Central giant cell lesions of the jaws. A clinical, radiologic, and histopathologic study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 75, n. 2, p. 199-208, 1993.

ZHOU, J.; CIDLOWSKI, J. A. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. **Steroids**, v. 70, n. 5-7, p. 407-17, 2005.

10 ANEXOS

ANEXO 1

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - UFG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Imunoexpressão de Osteocalcina e de Receptores da Calcitonina e Glicocorticoide em Lesão Central de Células Gigantes no complexo maxilo-mandibular.

Pesquisador: ALLISSON FILIPE LOPES MARTINS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 28073814.6.0000.5083

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 556.175

Data da Relatoria: 10/03/2014

Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa: Imunoexpressão de Osteocalcina e de Receptores da Calcitonina e Glicocorticoide em Lesão Central de Células Gigantes no complexo maxilo-mandibular. Pesquisador responsável: ALLISSON FILIPE LOPES MARTINS. N. CAAE: 28073814.6.0000.5083. Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia. Para este estudo, serão selecionadas amostras armazenadas no arquivo de Patologia Bucal da FO/UFG, 35 amostras de Lesão Central de Células Gigante (LCCG é uma lesão intraóssea benigna, idiopática. Os dados clínico-demográficos e de imagens serão coletados a partir dos prontuários e imagens radiográficas constantes dos prontuários da FO/UFG, constado, idade, gênero, localização, tempo de evolução, sintomatologia, sinal clínico (tumefação) e outros. Para análise qualitativa será empregada à técnica de Hematoxilina e Eosina: Avaliação quantitativa dos receptores de glicocorticoide, calcitonina e da proteína osteocalcina. Esta avaliação será realizada por meio de técnica imuno-histoquímica. Apresentam os seguintes documentos para análise: PB XML INTERFACE REBEC.xml; PB INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO 280738.pdf; Acesso ao arquivo CGDB.pdf; PROJETO LCCG FINAL.pdf; Folha de Rosto.pdf; Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Elismauro Francisco de Mendonca).pdf; Acesso ao arquivo Lab Patol Oral.pdf; Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Allisson Filipe Lopes Martins).pdf; PB INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO 280738.pdf; Aprovação

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prppg.ufg@gmail.com

Continuação do Parecer: 556.175

CDO.pdf.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Investigar a expressividade dos receptores de calcitonina e glicocorticoide e sua associação com a proteína osteocalcina em lesões central de células gigantes. Objetivo Secundário: Verificar se há diferenças na expressividade entre estes receptores quanto à positividade em baixa e alta expressão que possam definir possibilidades terapêuticas e auxiliar na classificação da lesão em agressiva e não agressiva. Caracterizar as LCCG investigadas com base nos dados clínico-demográficos e imagens em lesões com maior e menor potencial de agressividade e sua associação ou não com a expressividade destes marcadores.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Relatam a presente investigação apresenta como risco a possibilidade de vazamento de informações sobre os pacientes. Para minimizar esse risco os dados colhidos serão armazenados pelo pesquisador responsável e somente a equipe envolvida no estudo terá acesso aos mesmos. Benefícios: A investigação visa elucidar dúvidas existentes na literatura quanto ao tratamento da lesão, sendo que a pesquisa pode auxiliar na escolha de uma terapêutica mais apropriada para os pacientes acometidos pela doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Apresentam como hipótese: "As lesões que apresentarem uma maior imunexpressão de receptores da calcitonina, glicocorticoide também apresentarão maior expressão de osteocalcina, consequentemente classificadas em lesões menos agressivas". Critério de Inclusão: Blocos de pacientes que apresentaram lesões intraorais primárias e/ou recidivantes (apenas casos que tenham sido diagnosticados primariamente. Tomar-se-á precauções como: numeração dos casos selecionados, acesso limitado das informações aos pesquisadores envolvidos, utilizando meios, tais como tarjas, para não identificação do paciente em exames por imagem ou fotografias quando utilizadas, os dados colhidos serão utilizados somente para a pesquisa descrita. Realizaram artigos científicos, além de uma dissertação de mestrado e apresentações em congressos. A fim de se manter o anonimato dos participantes da pesquisa durante apresentações dos resultados, quando utilizado exames radiográficos, os dados contidos no exame que possam identificá-los serão tarjados ou removidos. Os resultados desse estudo se tornarão públicos independentes se forem favoráveis ou não. Não há motivos para suspender ou cancelar a pesquisa. Relatam que: pelo possível envolvimento de acadêmicos participantes, o

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prppg.ufg@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - UFG



Continuação do Parecer: 556.175

projeto poderá ser dividido em dois sub-projetos: Sub-projeto 1: Imunoexpressão de Osteocalcina e de Receptor da Calcitonina em Lesão Central de Células Gigantes no complexo maxilo-mandibular. o Objetivo geral: Investigar a expressividade do receptor de calcitonina e sua associação com a proteína osteocalcina em lesões central de células gigantes. Sub-projeto 2: Imunoexpressão de Receptor de Glicocorticoide em Lesão Central de Células Gigantes no complexo maxilo-mandibular.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Solicitam dispensa do TCLE e apresentam a seguinte justificativa: Diante da dificuldade de contato e localização dos pacientes, por se tratar de um centro de referência muitos pacientes são de outros municípios e ou outros estados, além disso, o arquivo de blocos conta com amostras com mais de quinze anos do diagnóstico..." Apresentam um orçamento de Valor Total do Projeto=R\$ 32.318,80 e mencionam que será desenvolvido com recursos do próprio pesquisador e de materiais já adquiridos com fomento de outras pesquisas realizadas no laboratório. O currículo dos pesquisadores são compatíveis com a pesquisa proposta e as instalações são adequadas. Garantem o anonimato e a confidencialidade dos participantes.

Recomendações:

Relatam que "Para este estudo, serão selecionadas amostras pertencentes ao arquivo de blocos de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás". Salientamos que a peça pertence ao paciente e não ao laboratório, o laboratório realiza somente a guarda deste material. Favor retificar esta colocação em projetos futuros.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise dos documentos postados, smj, deste comitê somos favoráveis à aprovação do presente protocolo

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Caso seja incluído novos participantes deverá ser encaminhado sob a forma de NOTIFICAÇÃO nome, currículo lattes e termo de compromisso de acordo com a Res. 466/2012 CNS.

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prppg.ufg@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - UFG



Continuação do Parecer: 556.175

GOIANIA, 13 de Março de 2014

Assinador por:
João Batista de Souza
(Coordenador)

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia **CEP:** 74.001-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prppg.ufg@gmail.com

Anexo 2

Normas da Revista: **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology**

ISSN: 1079-21-4

Qualis CAPES: A2

Section Scope Statements

The Oral and Maxillofacial Surgery Section aims to publish an extensive range of original articles that advances patient care through enhanced understanding of diagnosis, surgical and adjunctive treatment of diseases, and injuries and defects involving both the functional and esthetic aspects of the hard and soft tissues of the oral and maxillofacial regions. The section also seeks research regarding both the basic science of and management of persons with oral and maxillofacial conditions. Articles presenting ethical, original, well-documented, and reproducible research are given preference.

The Oral Medicine Section aims to publish a broad range of original articles that help clinicians understand more thoroughly the pathobiology, etiology, diagnosis, prevention, and management of oral conditions related to underlying medical conditions, including diseases of the head, neck, and oral mucosal structures, orofacial pain conditions, salivary gland disorders, and taste disorders. The section also seeks research regarding the dental management of persons with medical problems and/or complicated medical conditions. The published findings must contribute substantively to the body of oral medicine literature and should lead to improved clinical decision-making and enhanced care of medically-related disorders or conditions affecting the oral and maxillofacial region. Articles presenting original, well-documented, and reproducible research are preferred.

The Oral and Maxillofacial Pathology Section encourages the submission of original articles of high scientific quality that investigate the pathogenesis, diagnosis, and management of diseases affecting the oral and maxillofacial region. Submitted manuscripts may summarize findings from clinical, translational, or basic research in the broad field of oral and maxillofacial pathology but must contribute substantively to

the body of knowledge in this field and should be of obvious clinical and/or diagnostic significance to the practicing oral and maxillofacial pathologist. Areas of focus may include the investigation of disease pathogenesis, the diagnosis of disease using microscopic, clinical, radiographic, biochemical, molecular, or other methods as well as the natural history and management of patients with various conditions of the head, neck, and oral mucosal structures. Articles presenting novel and reproducible research that introduce new knowledge and observations are especially encouraged. This section also welcomes the submission of topical review papers on relevant subjects.

The Oral and Maxillofacial Radiology Section publishes original peer-reviewed contributions to the advancement of diagnostic clinical oral and maxillofacial radiology and related imaging sciences. The section considers original clinical and experimental research papers, technological developments, extensive systematic reviews of the literature, comprehensive pictorial reviews, special reports, and invited papers on subjects that will appeal to clinicians involved in the diagnostic imaging of hard and soft tissue maxillofacial pathology, selection criteria, computer-assisted diagnosis, craniofacial analysis, image-guided surgical navigation, image processing, dosimetry, radiation physics, biology, and safety.

The section also seeks extensive case series representing various expressions of particular conditions, descriptions of innovative imaging technique applications to these series, and description of novel imaging features to assist imaging specialists develop clinical protocols and interpretive knowledge based on multiple observations. Only papers contributing substantively to the body of knowledge in oral and maxillofacial imaging and performed with scientific rigor will be considered. These papers should assist clinicians in developing evidence-based practice and provide improved clinical decision-making regarding the performance of specific techniques and interpretation of resulting images affecting the oral and maxillofacial region. Diagnostic accuracy studies should conform to the principles of the STARD document External link <http://www.stard-statement.org>).

Types of Papers

1. Original Research Article. Reports of original research (preclinical, clinical, or translational) that are well-documented, novel, and significant. Original research manuscripts will be organized into six parts: (1) Abstract; (2) Introduction; (3) Materials and methods; (4) Results; (5) Discussion; (6) References.

2. Review article. Manuscripts that review the current status of a given topic, diagnosis, or treatment. These manuscripts should not be an exhaustive review of the literature but rather should be a review of contemporary thought with respect to the topic.

3. Clinicopathologic Conference (CPC). Manuscripts that present interesting, challenging, or unusual cases. The presentation should simulate clinical work-up, including the formulation of a detailed and well thought out differential diagnosis. The complete diagnostic evaluation, management, and follow-up must be included. CPC articles must be organized into six parts: (1) Title: Provide a descriptive clinical title that does not reveal the final diagnosis. (2) Clinical presentation: Describe the clinical and imaging characteristics of the lesion. Use clinical photographs and radiographs as appropriate. (3) Differential diagnosis: List and discuss lesions to be considered as reasonable diagnostic possibilities. The authors are reminded that the most important part of the CPC manuscript is the clinical differential diagnosis, where the authors guide the readership through their own diagnostic thought process. This will require the formulation of a list of the most probable diagnostic possibilities (ideally at least 5-6 entities) based on the clinical presentation, medical history, and/or radiographic studies. (4) Diagnosis: Histopathologic findings illustrated with appropriate photomicrographs. (5) Management: Describe the treatment of the patient and response to treatment. (6) Discussion: Concentrate on the most interesting aspect(s) of the case. No abstract is needed for CPC manuscripts.

4. Medical Management and Pharmacology Update (MMPU). This section is intended to provide concise, current reviews of medical problems and how they relate to dentistry. Manuscripts should include a good review of the clinical aspects of the disease, stressing the impact of the disease on the dental management and dental treatment of the patient. Emphasis should be placed on new developments, new research, or new approaches to therapy or management. Manuscripts should not be an exhaustive review of the literature but rather a review of contemporary thought

with respect to the topic. Likewise, the bibliography need not be all inclusive but rather should include only seminal, contemporary references deemed by the author to be most pertinent. The desired format for manuscripts submitted for the MMPU section includes: (1) abstract; (2) topic introduction/overview; (3) epidemiology/demographics; (4) etiology and pathogenesis; (5) clinical presentation/physical findings; (6) diagnosis (laboratory tests, diagnostic imaging, etc.); (7) medical management and treatment; (8) complications; (9) prognosis; oral manifestations/dental implications and significance; and (10) dental management (of patients with the disease). Manuscripts should not exceed 12 pages in 12-point, double-spaced Times New Roman (tables and figures count toward the 12-page limit).

5. Pharmacology Update is a component of the MMPU section that offers the reader the opportunity to obtain concise information regarding drugs used in the practice of medicine, clinical dentistry, and dental specialties. Manuscripts should present clearly and concisely the background information regarding the disease or condition that is managed, the indications, rationale for and approved uses of the specific drugs or class of drugs, the advantages and benefits of the drug or drug class over previous drugs, mechanism of action, criteria for selection, usual dosage, pharmacokinetics, adverse effects, drug interactions, and oral health and dental management considerations. Emphasis should be placed on new developments, effectiveness in clinical trials, therapeutic outcomes, and safety. Manuscripts should reflect contemporary thought with respect to the topic. Use of figures to illustrate the mechanism of action and tables to present therapeutic outcomes, drug interactions, and adverse effects are encouraged. Manuscripts should utilize the MMPU categories for formatting the paper. Text should not exceed 3,000 words. Font should be 12-point, double-spaced Times New Roman. A maximum of 50 references is recommended.

6. Case Reports. These types of publications often add little to the scientific knowledge base. However, excellent case reports may be published as online only papers if they meet certain criteria, such as: (1) rare or unusual lesions/conditions that need documentation, (2) well-documented cases showing unusual or "atypical" clinical or microscopic features or behavior, or (3) cases showing good long-term

follow-up information, particularly in areas in which good statistics on results of treatment are needed.

General inquiries and communications regarding editorial management should be addressed to Alice M. Landwehr, Managing Editor: tripleOjournal@gmail.com.

General correspondence to the Editor-in-Chief, Mark W. Lingen, DDS, PhD: Mark.Lingen@uchospitals.edu

Publisher-specific inquiries should be addressed to: Jane Ryley, Elsevier Inc., 3251 Riverport Lane, Maryland Heights, MO 63043; e-mail: J.Ryley@Elsevier.com.

Issue Manager, Jill Shepherd. Telephone: (352) 483-8113; fax: (352) 483-3417; e-mail: J.Shepherd@Elsevier.com.

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see External link <http://www.elsevier.com/publishingethics> and External link <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. See also External link <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: External link http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see External link <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors

of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Clinical trial results

In line with the position of the International Committee of Medical Journal Editors, the journal will not consider results posted in the same clinical trials registry in which primary registration resides to be prior publication if the results posted are presented in the form of a brief structured (less than 500 words) abstract or table. However, divulging results in other circumstances (e.g., investors' meetings) is discouraged and may jeopardise consideration of the manuscript. Authors should fully disclose all posting in registries of results of the same or closely related work.

Registration of clinical trials

Registration in a public trials registry is a condition for publication of clinical trials in this journal in accordance with International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE, External link <http://www.icmje.org>) recommendations. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. A clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example drugs, surgical procedures, devices, behavioural treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

For subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see External link <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult External link <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult External link <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see External link <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see External link <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see External link <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see External link
<http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit External link <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (External link <http://www.elsevier.com/access>)

- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies, External link <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. This ensures authors can comply with funding body open access requirements, including specific user licenses, such as CC BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. If you need to comply with your funding body policy, you can apply for the CC BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is \$3,000, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: [External link](#)
<http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop ([External link](#)
<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site ([External link](#) <http://support.elsevier.com>) for more information.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals, [External link](#) <http://www.elsevier.com/patient-consent-policy>. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via External link <http://ees.elsevier.com/tripleo>.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: External link <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class `elsarticle.cls` (External link <http://www.ctan.org/tex-archive/macros/latex/contrib/elsarticle>) to prepare your manuscript and BibTeX (External link <http://www.bibtex.org>) to generate your bibliography.

For detailed submission instructions, templates and other information on LaTeX, see External link <http://www.elsevier.com/latex>.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential Title Page Information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names, academic degrees, positions, and institutional affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.
- Disclosures must appear on the title page (see "Conflict of Interest" above).

Abstract

Statement of Clinical Relevance

For Original research, Review, and MPMU manuscripts, please provide a brief statement of no more than 40 words that succinctly summarizes the clinical relevance of the findings described in your manuscript.

Methods

As relevant, the Methods section should describe in adequate detail the experimental subjects, their important characteristics, and the methods, apparatus, and procedures used so that other researchers can reproduce the experiment. When the paper reports experiments on human subjects, the methods section must indicate that the protocol was reviewed by the appropriate institutional review board (IRB), is in compliance with the Helsinki Declaration, and that each subject in the project signed a detailed informed consent form.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes

into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

External link <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Submit color illustrations as original photographs, high-quality computer prints or transparencies, close to the size expected in publication, or as 35 mm slides. Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. For further information on the preparation of electronic artwork, please see External link <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale'(for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's WebShop (External link

<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the

reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference Style

Text: Indicate references by superscript number(s) in the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated.^{3,6} Barnaby and Jones⁸ obtained a different result'

List: Number the references in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

1. J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

2. W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

3. G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: External link <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: External link <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our

video instruction pages at External link <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary Data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: External link <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at External link <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Upload material, figures, and tables for online publication under the submission item "Supplementary Material" through the EES system. Be sure to change the description of the Supplementary Material to reflect the content; for example, Supplementary Detailed Methodology, Supplementary Figure Sx, Supplementary Table Sx.

Please order material such as Figures and Supplemental Figures separately in order of the callouts/first mentions in the text. For example: Figure 1, Figure 2; Supplemental Figure S1, Supplemental Figure S2, etc.

In the text be sure that you add behind the reference to the supplemental material "(Supplemental Table Sx; available at [URL/link*])." *To be provided by the production department.

NEW! Virtual Microscope Feature

After submission of your paper, if it contains conventional slide images, you will receive an invitation to complement the low resolution slide images with high resolution versions for use with the Virtual Microscope. After accepting the invitation, you will have the opportunity to upload the high resolution slide images using the Virtual Microscope authoring system and will receive instructions on how to include references to the high resolution slides in your manuscript. Readers of your final, published paper will be able to see the slides at their highest resolution using the Virtual Microscope and can link from the article straight to the slides. For more information about the Virtual Microscope: External link <http://www.elsevier.com/about/content-innovation/virtual-microscope>.

For uploading of the slide images or for support, please contact virtualmicroscope@elsevier.com

Letters to the Editor

Letters to the Editor should be a succinct comment pertaining to a paper(s) published in the Journal within the past year or to related topics. Provide a unique title for the Letter on the title page with complete contact information for the author(s). Double-space the text of the Letter. References, including reference to the pertinent article(s) in the Journal, should conform to style for manuscripts (see References). If accepted, the author(s) of the pertinent article(s) may be contacted to prepare a response to the comment.

Announcements

Announcements must be received by the Editorial Office at least 10 weeks before the desired month of publication. Items published at no charge include those received from a sponsoring society of the Journal; courses and conferences sponsored by state, regional, or national dental organizations; and programs for the dental profession sponsored by government agencies. All other announcements selected for publication by the Editor carry a charge of \$60 US, and the fee must accompany the request to publish.

Submission Checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

- Letter of submission, to include disclosure of any previous publications or submissions with any overlapping information
- Statement of clinical relevance (uploaded separately)
- Title page
- Title of article
- Full names(s), academic degree(s), affiliation(s) and titles of author(s)
- Author to whom correspondence, proof, and reprint requests are to be sent, including address and business and home telephone numbers, fax number, and e-mail address
- Any conflict of interest statement(s), disclosure(s), and/or financial support information, including donations
- Word count for the abstract (if relevant to article type), a complete manuscript word count (to include body text and figure legends), number of references, and number of figures/tables
- Structured abstract (double-spaced as part of manuscript file), as relevant to article type
- Article proper (double-spaced)
- Statement of IRB review and compliance with Helsinki Declaration (stated in Methods section of manuscript, as relevant)
- References (double-spaced on a separate page of the manuscript file)
- Figure legends (double-spaced, on a separate page of the manuscript file)

___ Tables (double-spaced, uploaded separately as word processing [eg, .doc] files)

___ Illustrations, properly formatted (uploaded as separate files)

___ Video/computer graphics, properly formatted (uploaded as separate files)

___ Signed permission to reproduce any previously published material, in all forms and media (scanned in as a file and uploaded as Permission)

___ Signed permission to publish photographs of identifiable persons from the individual or legal guardian specifying permission in all forms and media (scanned in as a file and uploaded as Permission)

For any further information please visit our customer support site at External link <http://support.elsevier.com>.

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B):

External link <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 9 (or higher)

available free from External link <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: External link <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

You can track your submitted article at External link http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/. You can track your accepted article at External link <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via External link <http://support.elsevier.com>.