



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA E SAÚDE



VINÍCIUS RIO VERDE MELO MUNIZ

**Granuloma Central de Células Gigantes: Um Estudo Imuno-
histoquímico Comparativo**

Salvador, BA - Brasil

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA E SAÚDE

VINÍCIUS RIO VERDE MELO MUNIZ

**Granuloma Central de Células Gigantes: Um Estudo Imuno-
histoquímico Comparativo**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde, curso de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. JEAN NUNES DOS SANTOS

Salvador, BA - Brasil

2018

Muniz, Vinícius Rio Verde Melo

Granuloma Central de Células Gigantes: Um Estudo Imuno-histoquímico Comparativo /
Vinícius Rio Verde Melo Muniz. / Salvador 2018.
83 f.: il.

Orientador(a): Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos .
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde - Universidade
Federal da Bahia) – Faculdade de Odontologia. Salvador 2018.

1. Granuloma de Células Gigantes. 2. Fibroma Ossificante. 3. Imuno-histoquímica. 4. Células
gigantes. . I. Santos, Jean Nunes dos. II. Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA E SAÚDE**

TERMO DE APROVAÇÃO

C.D. VINÍCIUS RIO VERDE MELO MUNIZ

**“GRANULOMA CENTRAL DE CÉLULAS GIGANTES: UM ESTUDO
IMUNO-HISTOQUÍMICO COMPARATIVO”**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos (Orientador)

Professor da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Profa. Dra. Clarissa Araújo Gurgel Rocha (Examinador Interno)

Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Profa. Dra. Marcelle Alvarez Rossi (Examinador Externo)

Professora da Universidade Federal da Bahia - ICS

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Que forneceu a oportunidade e condições necessárias para que a minha trajetória até este momento fosse possível.

Aos meus pais Flávio e Valéria,

Mesmo estando distantes, são um porto seguro para os momentos de dificuldade pessoal e profissional.

À minha avó Berenice (*in memoriam*),

Pelo seu amor, bondade e simplicidade, que muito influenciaram a minha criação. Obrigado por tudo que fez por mim.

Ao meu irmão Pedro,

A convivência diária fortalece os traços que nos tornam unidos. Obrigado pelo companheirismo.

À minha noiva Larissa,

Seu incentivo e crença nas minhas capacidades são um constante estímulo para que eu enfrente os desafios da minha vida profissional, acadêmica e pessoal. Obrigado pelo seu amor, otimismo e companheirismo. Esta trajetória foi muito mais fácil ao seu lado.

À minha sogra Marileide e cunhadas Lorena e Ludmila,

Agradeço todo carinho com o qual me recebem na família, da qual já me considero um membro. O apoio de vocês foi e continua sendo fundamental, assim como a nossa convivência tem sido excepcional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos,

Por sempre buscar o meu melhor desempenho no desenvolvimento deste trabalho. Seus conhecimentos, dedicação e disponibilidade o tornam um exemplo de orientador, que nunca se mostrou ausente durante todo este período de pós-graduação. Obrigado pelas oportunidades concedidas a mim.

Ao Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes,

Pela inestimável contribuição para a realização desta pesquisa e pela recepção a mim prestada durante a semana que estive na FOUFBA.

À Profa. Dra. Maria Cristina Teixeira Cangussu,

Por sua enorme contribuição na realização das análises estatísticas deste trabalho. Obrigado por sua dedicação, paciência e disponibilidade em me ajudar.

À Profa. Dra. Marcelle Alvarez Rossi,

Por ter me recebido tão bem na disciplina de Anatomia da Cabeça e do Pescoço durante meu período de professor substituto. Obrigado pela confiança depositada em mim e por ter compartilhado um pouco de seu imenso conhecimento comigo.

À Profa. Dra. Clarissa Araújo Gurgel Rocha,

Por suas excelentes aulas na época da graduação e incentivo durante o período de monitoria na disciplina de Patologia I. Obrigado pela confiança e por fazer parte da minha trajetória acadêmica.

Ao Prof. Dr. Bráulio Carneiro Júnior,

Um exemplo de preceptor e servidor das Obras Sociais Irmã Dulce. Suas contribuições para realização deste trabalho foram muito importantes.

À Profa. Dra. Águida Cristina Gomes Henriques Leitão,

Sua dedicação e amor pelo que faz são inspiração para muitos que desejam seguir a carreira acadêmica. Obrigado pelas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Profa. Dra. Flávia Caló de Aquino Xavier,

Sua contribuição para a manutenção do LABI é extremamente valiosa para o programa de pós-graduação da FOUFBA. Obrigado pela disponibilidade e participação nesta etapa da minha vida.

Ao Prof. Dr. Roberto Almeida de Azevedo,

Agradeço imensamente a oportunidade a mim concedida, quando fui aprovado para participar do serviço de CTBMF da FOUFBA, o qual tem sido maravilhosamente conduzido por você. Parabéns pelos serviços prestados à sociedade.

Ao Prof. André Sampaio Souza,

Verdadeiro incentivador para meu ingresso na CTBMF. Obrigado pelas oportunidades concedidas.

À minha família,

Mesmo distante, está sempre me apoiando e acreditando nas minhas capacidades. Os momentos que conseguimos estar juntos, renovam as minhas energias.

Aos meus colegas de mestrado,

Foi incrível o nosso companheirismo durante este período de convivência. Não poderia ter havido uma turma melhor do que esta. Muito obrigado a todos.

Aos colegas e preceptores de residência,

A intensa convivência durante os três anos de residência foi extremamente engrandecedora e o apoio de vocês foi fundamental.

Aos colegas de faculdade,

Pela amizade de longa data, que se fortalece com o passar dos anos e que já gerou frutos como Gigi, a nossa linda mascote.

À Daniel e João,

Colegas de residência, com os quais tenho o prazer de compor uma equipe cirúrgica.

À Tayla e Edilson,

Pela contribuição prestada nas etapas laboratoriais desta pesquisa.

À Manuela,

Obrigado por contribuir com algumas etapas laboratoriais desta pesquisa. Com a sua ajuda e a de Ludmila, estas etapas puderam ser concluídas com maior celeridade.

À Sueli,

Por sua disponibilidade e contribuição em resolver as questões burocráticas do programa de pós-graduação.

À Faculdade de Odontologia da UFBA,

Instituição que me acolheu durante a graduação, especialização e agora na finalização de mais um ciclo da minha vida acadêmica.

À coordenação do programa de Pós-Graduação da FOUFBA,

Pela oportunidade de poder participar do ensino e da pesquisa, que juntamente com a extensão, compõem os três pilares da universidade.

Ao CNPq,

Pelo apoio financeiro durante o mestrado e incentivo à pesquisa brasileira.

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer
um pode começar agora e fazer um novo fim”*

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão imuno-histoquímica dos marcadores CD68, CD163, CD34, CD105, D2-40, p63, ciclina D1, Ki-67, SMA, DOG1, SHH e GLI1 em Granulomas Centrais de Células Gigantes não agressivos (GCCGNA) e Granulomas Centrais de Células Gigantes agressivos (GCCGAG), na tentativa de fornecer subsídios que possam distinguir estas lesões semelhantes histopatologicamente. A amostra foi composta por 12 GCCGNA, 11 GCCGAG e 04 Fibromas Ossificantes Juvenis (FOJ), para fins comparativos. Para avaliação dos marcadores, foram utilizados índices de marcação imuno-histoquímicos, que representavam expressões negativa, baixa e alta de acordo com a intensidade e proporção de marcações celulares. Todos os resultados foram submetidos à análise estatística. A avaliação dos dados clínicos revelou que os GCCGAG estiveram significativamente mais associados com dentes ($p = 0,047$), lesões de maior diâmetro ($p = 0,000$), sintomatologia associada ($p = 0,03$) e perfil radiográfico radiopaco ou misto ($p = 0,020$). A sintomatologia associada à lesão foi considerada um fator de risco 12 vezes maior para os GCCGAG ($p = 0,016$). Não houve diferença de expressão significativa dos marcadores entre GCCGNA e GCCGAG ($p > 0,05$). Apenas a expressão do CD34 entre Granulomas Centrais de Células Gigantes (GCCG) e FOJ e do GLI1 entre GCCGAG e FOJ foram significantes ($p = 0,00$ e $p = 0,03$, respectivamente). Em GCCGNA existiu correlação positiva apenas entre as expressões dos marcadores SHH e GLI1 ($p = 0,040$). Em contrapartida, houve correlação negativa entre o padrão vascular (CD34) e a expressão do GLI1 ($p = 0,050$), e entre a presença de miofibroblastos (SMA) e a expressão do SHH ($p = 0,031$). Em GCCGAG existiram correlações positivas entre CD68 e CD163 ($p = 0,031$), CD34 e D2-40 ($p = 0,04$) e entre GLI1 e ciclina D1 ($p = 0,030$). Além disso, observamos correlações positivas entre a expressão de vasos linfáticos (D2-40), expressão da ciclina D1 ($p = 0,045$) e presença de miofibroblastos (SMA) ($p = 0,027$). A correlação entre vasos neoformados (CD105) e a presença de células fagocitárias (CD68) foi negativa ($p = 0,040$). Deste modo, nossos resultados indicam não haver diferença de expressão proteica dos marcadores utilizados neste estudo entre GCCGNA e GCCGAG, assim como entre GCCG e FOJ, apesar dos FOJ terem apresentado maior densidade vascular e menor expressão dos componentes da via de sinalização Hedgehog (HH). Associação com dentes, lesões de maior diâmetro e sintomatologia associada à lesão estiveram associados com os GCCGAG, principalmente a sintomatologia associada à lesão, considerada um fator de risco significativo para estas lesões. A via de sinalização HH mostrou-se ativa em GCCG e, embora seus principais componentes (SHH e GLI1) tenham se mostrado positivamente correlacionados tanto em GCCGNA quanto em GCCGAG, os mesmos não estiveram correlacionados com a proliferação miofibroblástica, nem com a angiogênese em GCCG. Por fim, o papel dos vasos linfáticos em GCCG ainda precisa ser melhor estudado, embora pareça haver uma associação com a variante agressiva.

Palavras-chave: Granuloma de Células Gigantes, Fibroma Ossificante, imuno-histoquímica, células gigantes.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the immunohistochemical expression of the markers CD68, CD163, CD34, CD105, D2-40, p63, cyclin D1, Ki-67, SMA, DOG1, SHH and GLI1 in non-aggressive Central Giant Cell Granulomas (NACGCG) and aggressive Central Giant Cell Granulomas (AGCGCG), to provide subsidies to distinguish these histopathologically similar lesions. The sample consisted of 12 NACGCG, 11 AGCGCG and 04 Juvenile Ossifying Fibroma (JOF), for comparative purposes. To evaluate the markers, labeling index were used, which represented negative, low and high expressions according to the intensity and proportion of cells markings. All the results were submitted to statistical analysis. The assessment of clinical data revealed that AGCGCG were significantly more associated with teeth ($p = 0.047$), lesions of greater diameter ($p = 0.000$), associated symptomatology ($p = 0.03$) and radiopaque or mixed radiographic features ($p = 0.020$). The lesion-associated symptomatology was considered a 12-fold higher risk factor for AGCGCG ($p = 0.016$). There was no significant difference in expression of the markers between NACGCG and AGCGCG ($p > 0.05$). Only CD34 expression between Central Giant Cell Granulomas (CGCG) and JOF and GLI1 between AGCGCG and JOF were significant ($p = 0.00$ and $p = 0.03$, respectively). In NACGCG there was a positive correlation only between the expressions of the SHH and GLI1 markers ($p = 0.040$). Otherwise, there was a negative correlation between vascular pattern (CD34) and GLI1 expression ($p = 0.050$), and between the presence of myofibroblasts (SMA) and SHH expression ($p = 0.031$). In AGCGCG there were positive correlations between CD68 and CD163 ($p = 0.031$), CD34 and D2-40 ($p = 0.04$) and between GLI1 and cyclin D1 ($p = 0.030$). In addition, we observed positive correlations between the expression of lymphatic vessels (D2-40), cyclin D1 expression ($p = 0.045$) and presence of myofibroblasts (SMA) ($p = 0.027$). The correlation between neoformed vessels (CD105) and the presence of phagocytic cells (CD68) was negative ($p = 0.040$). Thus, our results indicate that there was no difference in the protein expression of the markers used in this study between NACGCG and AGCGCG, as well as between CGCG and JOF, although JOF presented a higher vascular density and less expression of the components of the Hedgehog (HH) signaling pathway. Association with teeth, larger lesions and symptomatology associated to the lesion were related with AGCGCG, mainly symptomatology associated with the lesion, considered a significant risk factor for these lesions. The HH pathway is active in CGCG and, although its main components (SHH and GLI1) have been positively correlated in both GCCGNA and GCCGAG, there was no correlation of its components with myofibroblastic proliferation or angiogenesis in CGCG. Finally, the role of lymph vessels in CGCG still needs to be better investigated, although there seems to be an association with the aggressive variant.

Keywords: Giant Cell Granuloma, Ossifying Fibroma, immunohistochemistry, giant cells.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografias dos casos de GCCG (CD68, CD163, CD34 e CD105). 38
- Figura 2.** Fotomicrografias dos casos de GCCG (p63, D2-40, ciclina D1 e Ki-67). 39
- Figura 3.** Fotomicrografias dos casos de GCCG (SMA, SHH e GLI1). 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas e radiográficas dos GCCGNA e GCCGAG.	30
Tabela 2. Especificidade dos marcadores.	32
Tabela 3. Dados clínicos dos GCCG.	42
Tabela 4. Comparação do IM entre GCCGAG, GCCGNA e FOJ.	43
Tabela 5. Correlações entre os IM dos marcadores nos GCCGN e GCCGAG.	45
Tabela 6. Regressão logística univariada entre variáveis e GCCG.	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Bcl-2	Refere-se ao gene <i>B-cell lymphoma 2</i>
bFGF	Do inglês, <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
CD31	Refere-se ao antígeno ou anticorpo CD31 (Do inglês, <i>Cluster of Differentiation 31</i>)
CD34	Refere-se ao antígeno ou anticorpo CD34 (Do inglês, <i>Cluster of Differentiation 34</i>)
CD68	Refere-se ao antígeno ou anticorpo CD68 (Do inglês, <i>Cluster of Differentiation 68</i>)
CD105	Refere-se ao antígeno ou anticorpo CD105 (Do inglês, <i>Cluster of Differentiation 105</i>)
CD163	Refere-se ao antígeno ou anticorpo CD163 (Do inglês, <i>Cluster of Differentiation 163</i>)
CG	Células gigantes multinucleadas
CM	Células mononucleares
CO	Ceratocisto odontogênico
Ciclina D1	Refere-se ao gene ou proteína ciclina D1 (CCND1)
D2-40	Refere-se ao antígeno ou anticorpo D2-40 (Podoplanina)
DHH	Refere-se à proteína ligante <i>Desert Hedgehog</i>
DOG1	Refere-se ao antígeno ou anticorpo DOG1 (Do inglês, <i>Discovered on GIST1</i>)
FGF	Do inglês, <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FOJ	Fibroma Ossificante Juvenil
FOUFBA	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GCCG	Granuloma Central de Células Gigantes
GCCGAG	Granuloma Central de Células Gigantes Agressivo
GCCGNA	Granuloma Central de Células Gigantes Não Agressivo
GIST	Do inglês, <i>Gastrointestinal Stromal Tumor</i>
GLI1	Proteína codificada pelo gene GLI1 (Do inglês, <i>Glioma-Associated Oncogene Homolog1</i>)
GPCG	Granuloma Periférico de Células Gigantes
HH	Hedgehog
IFN- γ	Refere-se à proteína interferon gama
IHH	Refere-se à proteína ligante <i>Indian Hedgehog</i>
IL-1	Refere-se à proteína Interleucina-1

IL-4	Refere-se à proteína Interleucina-4
IL-10	Refere-se à proteína Interleucina-10
IL-12	Refere-se à proteína Interleucina-12
Ki-67	Refere-se ao antígeno ou anticorpo Ki-67
M-CSF	Do inglês, <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MCP1	Do inglês, <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MEC	Matriz extracelular
Myc	Refere-se ao gene <i>Myelocytomatosis</i>
Np63	Refere-se à proteína p63 que não possui o domínio de ativação de transcrição
OMS	Organização Mundial de Saúde
p63	Refere-se o gene ou proteína p63
PCNA	Do inglês, <i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PDGF	Do inglês, <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PTCH	Refere-se ao gene ou proteína <i>Patched</i>
RANKL	Do inglês, <i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand</i>
SHH	Refere-se à proteína ligante <i>Sonic Hedgehog</i>
SMA	Refere-se ao antígeno ou anticorpo α -SMA (Do inglês, <i>Alpha Smooth Muscle Actin</i>)
SMO	Refere-se ao gene ou proteína <i>Smoothened</i>
TAp63	Refere-se à proteína p63 que possui o domínio de ativação de transcrição
TCG	Tumor de Células Gigantes
TGF- β	Do inglês, <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TNF- α	Do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor</i>
VEGF	Do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 GCCG	18
2.2 MARCADORES	20
2.2.1 CD68 e CD163	20
2.2.2 CD34, CD105 e D2-40	21
2.2.3 p63, ciclina D1 e Ki-67	22
2.2.4 SMA	23
2.2.5 DOG1	24
2.2.6 SHH e GLI1	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4 METODOLOGIA	28
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	28
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	28
4.3 ESTUDO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO	28
4.4 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO	29
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5 RESULTADOS	34
5.1 ASPECTOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS GERAIS	34
5.1.1 CD68	34
5.1.2 CD163	34
5.1.3 CD34	34
5.1.4 CD105	34
5.1.5 D2-40	34
5.1.6 p63	35
5.1.7 Ciclina D1	35
5.1.8 Ki-67	35
5.1.9 SMA	35
5.1.10 DOG1	35
5.1.11 SHH	35
5.1.12 GLI1	36
5.2 DADOS CLÍNICOS	40
5.3 EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA	41
5.4 CORRELAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICA	42
5.4 REGRESSÃO LOGÍSTICA	43
6 DISCUSSÃO	45
6.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA	49
7 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a atual classificação dos tumores da cabeça e do pescoço da Organização Mundial da Saúde (OMS), o Granuloma Central de Células Gigantes (GCCG) é considerado uma lesão osteolítica benigna e localizada dos maxilares, composta por células gigantes (CG) tipo osteoclastos dispostas em um estroma vascular, que pode apresentar características agressivas (EL-NAGGAR et al., 2017). Representa cerca de 10% dos tumores benignos dos ossos gnáticos (FLANAGAN; SPEIGHT, 2014) e a maior parte dos casos ocorrem em mulheres e pacientes jovens (DE LANGE; VAN DEN AKKER; KLIP, 2004; AHMED; DUNLAP, 2016; MAIZ; DE LA ROSA-GARCÍA; CAMACHO, 2016; SARGOLZAEI; TAGHAVI; POURSAFAR, 2017). A região anterior dos ossos maxilares é a mais acometida por estas lesões, com particular predileção pela mandíbula (DE LANGE; VAN DEN AKKER; KLIP, 2004; DE LANGE; VAN DEN AKKER, 2005; SUN et al., 2009; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2008).

O GCCG possui características histológicas semelhantes às encontradas em pacientes portadores de múltiplos GCCG (Querubismo), Tumor Marrom (AUSTIN; DAHLIN; ROYER, 1959) e Tumor de células gigantes (TCG) (AUCLAIR et al., 1988). Embora possuam características histológicas semelhantes, estas lesões apresentam comportamentos clínicos distintos, resultando em prognósticos variáveis (SMALL; ROWE, 1975; CHUONG; KABAN, 1985; AUCLAIR et al., 1988; DE SOUZA et al., 1999). Além disso, o papel das CG na patogênese destas lesões não está definido, apesar de alguns autores acreditarem que elas derivem de células sanguíneas mononucleares periféricas, recrutadas a partir de citocinas produzidas pelas células fusiformes estromais (NAGASAWA et al., 2002; ITONAGA et al., 2003; LIU; YU; LI, 2003). Dentre estas citocinas, destacam-se: interleucina-1 (IL-1) (AHMED; DUNLAP, 2016), interleucina-4 (IL-4) (AGHBALI et al., 2017), interleucina-12 (IL-12), interferon gama (IFN- γ), fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) (SYRIO et al., 2011; AHMED; DUNLAP; 2016), ligante do receptor de ativação do fator nuclear Kappa B (RANKL) (LIU; YU; LI, 2003; AHMED; DUNLAP; 2016), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e fator de crescimento transformador β (TGF- β) (DE MATOS et al., 2012).

A fim de fornecer subsídios para a compreensão do comportamento clínico dos GCCG, Chuong et al. (1986) dividiram estas lesões em agressivas e não agressivas. Diante do fato de que estas duas variantes possuem características histológicas semelhantes, diversos estudos têm sido realizados na tentativa de contribuir para estabelecer parâmetros imuno-histoquímicos que pudessem diferenciar os GCCG não agressivos (GCCGNA) dos agressivos (GCCGAG). Dentre estes estudos, destacam-se aqueles envolvendo proteínas expressas por macrófagos (O'MALLEY et al., 1997; LIU; YU; LI, 2003; TORABINIA; RAZAVI; SHOKROLAHI, 2011; VARSHA et al., 2014; KUJAN et al., 2015; KAHN et al., 2017; SARGOLZAEI; TAGHAVI; POURSAFAR, 2017), proteínas vasculares (O'MALLEY et al., 1997; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012; FALCI et al., 2014; VARSHA et al., 2014; KUMAR et al., 2016), proteínas reguladoras do ciclo celular (DE SOUZA et al., 1999; SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000; KAUZMAN et al., 2003; DICKSON et al., 2008; LEE et al., 2008; HAMMAS et al., 2012; KUJAN et al., 2015) e proteínas expressas por fibroblastos com diferenciação muscular (O'MALLEY et al., 1997; VERED et al., 2007; KUJAN et al., 2015; MAIZ; DE LA ROSA-GARCÍA; CAMACHO, 2016). Porém, ainda são poucos os estudos que avaliam e comparam a expressão imuno-histoquímica entre os GCCGNA e GCCGAG (O'MALLEY et al., 1997; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; VERED et al., 2007; DEWSNUP et al., 2008; SUSARLA et al., 2009; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012; KAHN et al., 2017). Desta forma, parece que ainda não foi possível estabelecer um perfil imuno-histoquímico que pudesse distinguir e auxiliar na compreensão do prognóstico e tratamento dos GCCG.

Portanto, este trabalho busca auxiliar na compreensão de parâmetros imuno-histoquímicos que possam distinguir GCCGNA de GCCGAG, lesões histopatologicamente semelhantes e que apresentam comportamentos clínicos discrepantes. Para tal, pretende-se estudar, por reações imuno-histoquímicas, proteínas que identifiquem a presença de macrófagos (marcadores CD68 e CD163), padrão vascular (marcadores CD34, CD105 e D2-40), expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular (marcadores p63, ciclina D1 e Ki-67), presença de miofibroblastos (marcador SMA), imunoexpressão frente ao marcador DOG1 (AKPALO; LANGE; ZUSTIN, 2012) e expressão de componentes da via de sinalização Hedgehog (HH) (marcadores SHH e GLI1). Para fins comparativos, serão incluídos casos de Fibromas

Ossificantes Juvenis (FOJ), uma neoplasia fibro-óssea benigna igualmente agressiva, que pode causar grandes destruições dos ossos gnáticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GCCG

O GCCG é uma lesão osteolítica benigna e localizada dos maxilares, composta por CG tipo osteoclastos dispostas em um estroma vascular, que pode apresentar características agressivas (EL-NAGGAR et al., 2017). Acomete, com maior frequência, crianças e adultos jovens, com mais de 75% dos casos ocorrendo antes dos 30 anos de idade. Mulheres são afetadas em uma proporção aproximadamente duas vezes maior em relação aos homens (WHITAKER; WALDRON, 1993; ITONAGA et al., 2003; FLANAGAN; SPEIGHT, 2014).

Estas lesões podem fazer parte do mesmo processo patológico dos TCG, os quais podem ocorrer em qualquer área do esqueleto ósseo, sendo mais frequentemente encontrados em epífises de ossos longos (KAUZMAN et al., 2004; KUJAN et al., 2015). Os GCCG podem apresentar desde um crescimento lento e assintomático, descobertos em exames radiográficos de rotina, até lesões mais agressivas com sintomatologia dolorosa, crescimento rápido e expansivo, podendo causar reabsorção radicular e deslocamento dentário, além de elevados índices de recorrência (CHUONG; KABAN, 1985; WHITAKER; WALDRON, 1993; DE LANGE; VAN DEN AKKER, 2005; KRUSE-LÖSLER et al., 2006).

Pelos motivos acima descritos, os GCCG são usualmente classificados em lesões agressivas e não agressivas de acordo com características clínico-radiográficas. Segundo Chuong et al. (1986) e Peacock; Jordan; Schmidt (2012), existem critérios usualmente utilizados neste tipo de classificação, sendo que para os GCCG serem considerados agressivos devem possuir tamanho maior do que 5,0 cm (PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012) ou pelo menos três dos cinco critérios descritos a seguir: sintomatologia dolorosa, crescimento rápido, reabsorção radicular, deslocamento dentário, perfuração de cortical e/ou recorrência após procedimento cirúrgico de enucleação e curetagem (CHUONG et al., 1986; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012). As lesões que não atendam os critérios citados anteriormente, são classificadas como GCCGNA, ou seja, normalmente são menores do que 5,0 cm, assintomáticas, de crescimento lento, sem associação com dentes ou perfuração de cortical e com menores índices de recorrência.

As características clínicas dos GCCG geralmente se apresentam da seguinte forma: crescimento lento, expansivo, assintomático, com radiolucidez bem definida e sem reabsorção dentária (CHUONG et al., 1986; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2008; SUN et al., 2009). Lesões mais agressivas podem ser multiloculares (DE LANGE; VAN DEN AKKER; VAN DEN BERG, 2007; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2008; SUN et al., 2009) e cerca de 30% dos casos seguem um curso clínico agressivo (VERED; BUCHNER; DAYAN, 2008) caracterizado por dor, reabsorção e deslocamento dentários, perfuração de cortical e invasão de tecidos adjacentes (CHUONG et al., 1986; WHITAKER; WALDRON, 1993; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2008). Além destas características, os GCCG agressivos apresentam maior prevalência em crianças do que em adultos (CHUONG et al., 1986; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2008; SUN et al., 2009).

Histologicamente, esta lesão é caracterizada por uma proliferação não encapsulada de células mononucleares (CM) fusiformes e poligonais, permeadas por células multinucleadas tipo osteoclastos em um estroma vascularizado, com focos de hemorragia e pigmentação por hemossiderina (VERED; BUCHNER; DAYAN, 2008; TORABINIA; RAVAZI; SHOKROLAHI, 2011; FLANAGAN; SPEIGHT, 2014). A lesão pode apresentar uma arquitetura lobular, separada por septos fibrosos e presença de osteoide e tecido ósseo. As CG dos GCCG são reativas para os marcadores de macrófagos e osteoclastos e as CM são os componentes proliferativos da lesão (VERED; BUCHNER; DAYAN, 2008; TORABINIA; RAVAZI; SHOKROLAHI, 2011; FLANAGAN; SPEIGHT, 2014).

A maioria dos GCCG responde favoravelmente ao tratamento de curetagem local, enquanto altos índices de recorrência estão associados à um comportamento clínico agressivo e associação com síndromes como Noonan e Neurofibromatose tipo 1 (DE LANGE; VAN DEN AKKER; VAN DEN BERG, 2007; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2008). Para limitar as margens de ressecção de grandes lesões, drogas intralesionais ou sistêmicas como corticosteroides, calcitonina de salmão, interferon α e, mais recentemente, o inibidor (Denosumab) do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) têm sido utilizadas (NAIDU et al., 2014; SCHREUDER et al., 2014; GUPTA et al., 2015; O'CONNELL et al., 2015; BREDELL et al., 2017).

2.2 MARCADORES

2.2.1 CD68 e CD163

O CD 68 é uma glicoproteína presente em macrófagos, monócitos e na membrana de lisossomos (HOLNESS; SIMMONS, 2017), sendo utilizada na identificação de macrófagos ou de seus precursores em vários tumores (BINGLE; BROWN; LEWIS, 2002; ALLAVENA et al., 2008; SICA et al., 2008), incluindo os GCCG (TORABINIA; RAVAZI; SHOKROLAHI, 2011; VARSHA et al., 2014; KUJAN et al., 2015; KAHN et al., 2017). O CD163 é um marcador específico de monócitos/macrófagos, expresso predominantemente em células com potencial anti-inflamatório (VAN GORP; DELPUTTE; NAUWYNCK, 2010). Sua expressão é induzida por mediadores anti-inflamatórios tais como glicocorticoides e interleucina-10 (IL-10), sendo inibida por mediadores pró-inflamatórios como o IFN- γ (SULAHIAN et al., 2000).

Existem dois tipos básicos de macrófagos: M1 e M2. Os macrófagos M1 são ativados pela via clássica, possuindo papel fundamental no estabelecimento do processo inflamatório, ou seja, são considerados agentes pró-inflamatórios e ainda possuem função antitumoral. Os macrófagos M2, considerados supressores inflamatórios, são ativados pela via alternativa, participando do processo de reparação tecidual, principalmente através do estímulo angiogênico. Promovem ainda a progressão do tumor através do aumento da densidade vascular de um tecido tumoral, aumentando a oxigenação e disponibilização de nutrientes para as células tumorais (SICA et al., 2006; SICA et al., 2008; TAKEYA; KOMOHARA, 2016). Além disso, são responsáveis pela produção de moléculas imunossupressoras, que suprimem a imunidade anti-tumoral mediada por células T, e possuem papel fundamental no processo de invasão tecidual e metástase (TAKEYA; KOMOHARA, 2016).

Em GCCG dos maxilares, tanto as CM quanto as CG têm apresentado imunopositividade para o CD68 (O'MALLEY et al., 1997; LIU; YU; LI, 2003; TORABINIA; RAVAZI; SHOKROLAHI, 2011; VARSHA et al., 2014; KUJAN et al., 2015; KAHN et al., 2017; SARGOLZAEI; TAGHAVI; POURSAFAR, 2017). Kahn et al. (2017) avaliaram se a idade e a expressão do CD163 estariam associadas ao comportamento clínico destas lesões, verificando que, assim como para o CD68, as CM e CG apresentaram imunopositividade para este marcador, concluindo que idade

avançada e alta expressão de CG para o CD163 seriam fatores preditores para os GCCGNA. Para nosso conhecimento não existem outros estudos que avaliem o papel do marcador CD163 nos GCCG.

2.2.2 CD34, CD105 e D2-40

Constantemente expressa no endotélio vascular, a glicoproteína de superfície celular CD34 é por vezes utilizada para avaliação da densidade vascular presente em GCCGNA e GCCGAG, com maior expressão nas lesões consideradas agressivas (DEWSNUP et al., 2008; SUSARLA et al., 2009; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012). Este anticorpo é um conhecido marcador de células endoteliais de tecidos normais e neoplásicos (PUSZTASZERI; SEELENTAG; BOSMAN, 2006), porém é incapaz de diferenciar vasos pré-existentes de vasos neoformados. Por outro lado, o CD105, uma proteína de membrana vascular, está altamente expressa em vasos neoformados (CHEIFETZ et al., 1992). Este marcador tem sido utilizado na avaliação de malformações vasculares e granulomas piogênicos (VASCONCELOS et al., 2011), mas o seu papel nos GCCG ainda é desconhecido (FALCI et al., 2014).

Utilizada para avaliação da invasão linfática em diversas lesões (KAHN; MARKS, 2002; NAKAYAMA; EUZAN; YASUI, 2013; CABIBI et al., 2015; TAJIMA; FUKAYAMA, 2015), a proteína D2-40 é identificada por um anticorpo monoclonal, ou seja, é capaz de identificar apenas um antígeno específico, como um epítipo de determinada proteína. Este anticorpo vem sendo considerado um marcador confiável de invasão linfática por alguns estudos (DOEDEN et al., 2009; MOHAMMED et al., 2011), pois é capaz de se ligar à um epítipo presente nas moléculas de podoplanina, uma glicoproteína transmembrana presente principalmente na interface luminal de vasos linfáticos (ESSNER, 2006). Na patogênese dos GCCG, o papel dos vasos linfáticos ainda é incerto (FALCI et al., 2014).

Existem alguns estudos que avaliam o papel destes marcadores vasculares em GCCG, principalmente o CD34 (O'MALLEY et al, 1997; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012; FALCI et al., 2014; VARSHA et al., 2014; KUMAR et al., 2016). Apenas um estudo utilizou os marcadores CD105 e D2-40 para avaliar angiogênese e linfangiogênese nestas lesões (FALCI et al, 2014). Todos estes estudos verificaram, em graus variáveis, imunopositividade para os marcadores acima descritos em GCCG.

Peacock; Jordan; Schmidt (2012) compararam GCCGNA com GCCGAG através da utilização de marcadores vasculares, dentre eles o CD34, que também apresentaram graus variados de imunomarcção e permitiram concluir que houve maior grau de vascularização e angiogênese nos GCCGAG do que nos GCCGNA.

2.2.3 p63, ciclina D1 e Ki-67

A proteína p63 participa do ciclo celular e aparenta desempenhar papel fundamental para manutenção de uma população de células precursoras em diversos tecidos epiteliais. A falha na transdução desta proteína pode desencadear síndromes congênitas que afetam tecidos epiteliais (CELLI et al., 1999). O gene p63 é um membro da família do gene p53 sendo expresso em seis isoformas de proteínas, que são divididas em dois grupos, aquelas que contém o domínio de ativação de transcrição (isoformas TA) e aquelas que não possuem (isoformas N). Assim como as proteínas codificadas pelo gene p53, as proteínas TAp63 atuam em genes alvo específicos induzindo a parada do ciclo celular e apoptose (OSADA et al., 1998; LITTLE; JOCHEMSEN, 2001).

As proteínas Np63, por sua vez, atuam de maneira dominante negativa, inibindo a ativação da transcrição das proteínas TAp63 e p53 (LITTLE; JOCHEMSEN, 2001). Esta última controla pontos de verificação responsáveis por regular a entrada da célula na próxima fase do ciclo celular em células normais (JALAVA et al., 2006). Neste caso, o p53 atua como fator de transcrição induzindo a formação da proteína p21, que possui função inibidora de quinase dependente de ciclina, desacelerando o ciclo celular. Este mecanismo proporciona tempo para o processo de reparação do DNA (JALAVA et al., 2006). Se o DNA estiver danificado após o reparo, a p53 pode induzir apoptose (ELLIS et al., 1997). Neste contexto, as isoformas proteicas TAp63 e Np63 possuem atividades de supressão tumoral e oncogênicas, respectivamente (LITTLE; JOCHEMSEN, 2001).

Alterações nas proteínas reguladoras do ciclo celular, principalmente aquelas que regulam a transição entre as fases G1 e S, têm sido associadas à patogênese de uma grande variedade de tumores humanos incluindo os TCG (DIEHL, 2002; KAUZMAN et al., 2003). Dentre os reguladores do ciclo celular, a ciclina D1 tem se mostrado constantemente expressa (DIEHL, 2002; FU et al., 2004), sendo considerada uma proteína que ativa as quinases ciclina-dependentes e regula a passagem das células através do ponto de restrição G1/S do ciclo celular (SHERR, 1996).

Como é de se esperar, as ciclinas envolvidas na progressão do ciclo celular apresentam expressão aberrante no desenvolvimento de tumores, enquanto proteínas que desaceleram a divisão celular, como as inibidoras das quinases ciclina-dependentes, estão frequentemente inativadas (HIRAMA; KOEFFLER, 1995). Dentre as proteínas reguladoras do ciclo celular associadas ao desenvolvimento de neoplasias malignas, a ciclina D1 é uma das mais prevalentes. Portanto, a sua expressão aberrante transfere o controle normal do ciclo celular das células para um processo de transformação maligna (DONNELLAN; CHETTY, 1998).

Outra proteína participante do ciclo celular é o Ki-67, sendo utilizada como um marcador de proliferação celular (O'MALLEY et al., 1997). É considerada uma proteína não-histônica (GERDES et al., 1991; MCCORMICK et al., 1993), codificada por um único gene no cromossomo 10 (MCCORMICK et al., 1993), que está presente na matriz nuclear durante a interfase da mitose ligando-se ao cromossomo (VERHEIJEN et al., 1989). Com exceção da fase G0 (célula em repouso) (SCHOLZEN; GERDES, 2000; JALAVA et al., 2006), está presente em todas as fases ativas do ciclo celular (SOUZA et al., 1999; SCHOLZEN; GERDES, 2000; JALAVA et al., 2006).

Com relação aos estudos que avaliaram estes marcadores em GCCG, pode-se observar que, em todos, apenas as CM apresentaram imunopositividade para o Ki-67, embasando o fato destas células serem consideradas os componentes proliferativos desta lesão (DE SOUZA et al., 1999; DE SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000; KAUZMAN et al., 2003; KUJAN et al., 2015). Em contrapartida, as CM e CG destas lesões apresentam imunonegatividade para o p63, sugerindo que os GCCG possuem uma patogênese distinta dos TCG, que apresentam expressão positiva para o p63 em CM (DICKSON et al., 2008; LEE et al., 2008; HAMMAS et al., 2012). A expressão da ciclina D1 tanto em CM quanto em CG é considerada positiva, com maior expressão por parte das últimas (KAUZMAN et al., 2003).

2.2.4 SMA

O SMA (smooth muscle actin) é uma proteína utilizada como marcador de células musculares lisas, especialmente os miofibroblastos (WANG et al., 2014). Este marcador reage com a actomiosina (complexo proteico formado por actina e miosina) e diferentes antígenos dos músculos lisos, que constituem o citoesqueleto celular (GIULIA et al.,

2016). Os miofibroblastos são células especializadas que fazem parte dos tecidos de cicatrização normais e de lesões malignas e benignas (DARBY; HEWITSON, 2007; KELLERMANN et al., 2007; FREGNANI et al., 2009). Podem estar associados com o comportamento agressivo de lesões que não contém células gigantes (FREGNANI et al., 2009; DING et al., 2014), com invasão tumoral e com um pior prognóstico de carcinomas orais de células escamosas, por exemplo (VERED et al., 2005; KELLERMANN et al., 2007; DING et al., 2014).

O crescimento de um tumor é determinado não apenas por suas células proliferativas, mas também pelo seu estroma, no qual os fibroblastos podem se tornar uma importante subpopulação que contribui para o crescimento e progressão tumoral (KALLURI, 2003). Estes fibroblastos adquirem um fenótipo específico permitindo que sejam identificados pela expressão da SMA. A função destas células baseia-se na produção de citocinas, fatores de crescimento e produção de matriz extracelular, participando do processo de angiogênese e recrutamento de células endoteliais (KALLURI; ZEISBERG, 2006). Dentre estas citocinas e fatores de crescimento, destacam-se: proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP1), proteases degradantes de matriz extracelular (MEC), TGF- β , VEGF, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF2) (KALLURI; ZEISBERG, 2006).

Nos GCCG ou TCG, a presença de imunopositividade para esta proteína indica uma diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (O`MALLEY et al., 1997; KUJAN et al., 2015), que pode estar associada com a presença de vasos sanguíneos neoformados (KUJAN et al., 2015). Estudos imuno-histoquímicos prévios comprovam que os miofibroblastos são componentes integrais do estroma de GCCG (O`MALLEY et al., 1997; VERED et al., 2007; KUJAN et al., 2015; MAIZ; DE LA ROSA-GARCÍA; CAMACHO, 2016), mas parece não haver diferenças da sua expressão entre GCCGNA e GCCGAG (VERED et al., 2007).

2.2.5 DOG1

DOG1 (discovered on GIST1) é uma proteína transmembrana expressa predominantemente na membrana plasmática de tumores estromais gastrointestinais (GIST) e raramente expressa em outros tumores de tecidos moles, que, devido à aparência, podem ser confundidos com GIST. (ESPINOSA et al., 2008; LIEGL et al.,

2009; LEE; LIANG; ESPINOSA, 2010). Esta proteína pode ser utilizada no diagnóstico diferencial de condroblastomas e TCG, pois condroblastomas apresentam imunopositividade para este marcador enquanto os TCG apresentam expressão negativa (AKPALO; LANGE; ZUSTIN, 2012). Até o momento não existem estudos que avaliem este marcador em GCCG.

2.2.6 SHH e GLI1

A via de sinalização Hedgehog (HH) é conhecida por desempenhar um papel chave no desenvolvimento embrionário de vários órgãos, incluindo os dentes (HARDCASTLE et al., 1998), permanecendo inativa após este período (HARDCASTLE et al., 1998; INGHAM; MCMAHON, 2001; CHARI; MCDONNELL, 2007; HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013). A desregulação desta via está associada ao desenvolvimento e progressão de tumores, como o Carcinoma Escamocelular de boca (BUIM et al., 2011). Uma das formas que a via HH pode participar da progressão tumoral é através do estímulo à angiogênese (VALVERDE et al., 2012).

Em humanos, esta via é ativada pelo ligante Sonic Hedgehog (SHH), que se liga aos receptores transmembrana patched (PTCH1 e PTCH2), resultando na liberação da atividade sinalizadora da proteína smoothed (SMO). Este processo culmina na ativação e translocação do fator de transcrição GLI-Krüppel (GLI1, 2 e 3), especialmente o GLI1, provocando a ativação transcricional de genes alvo, como o gene responsável pela transcrição da ciclina D1 (CCND1) (CHARI; MCDONNELL, 2007; SCALES; DE SAUVAGE, 2009). A ativação dos genes alvos está envolvida em uma variedade de funções celulares, como proliferação e sobrevivência celular, transição epitélio-mesênquima, manutenção de células-tronco teciduais, angiogênese e destino celular (MERCHANT; SAQUI-SALCES, 2014). Adicionalmente, os genes GLI e PTCH1 são alvos da via, caracterizando desta forma, um mecanismo de retroalimentação (COHEN, 2012; MCMILLAN; MATSUI, 2012; MERCHANT; SAQUI-SALCES, 2014).

Como a expressão aberrante da via HH após o período embrionário tem sido associada ao desenvolvimento e progressão de alguns tumores humanos, incluindo cânceres de próstata (KARHADKAR et al., 2004; CHARI; MCDONNELL, 2007), trato gastrointestinal (BERMAN et al., 2003) e mama (KATANO, 2005; MUKHERJEE et al.,

2006), alguns estudos têm considerado os componentes desta via como potenciais alvos terapêuticos e pesquisas têm sido direcionadas no sentido de desenvolver drogas, tais como inibidores de SMO e antagonistas do GLI (COHEN, 2012; MCMILLAN; MATSUI, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; CONI; INFANTE; GULINO, 2013). Para nosso conhecimento, este será o primeiro estudo a avaliar o papel de componentes da via de sinalização HH em GCCG.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão imuno-histoquímica dos marcadores CD68, CD163, CD34, CD105, D2-40, p63, ciclina D1, Ki-67, SMA, DOG1, SHH e GLI1 em GCCGNA e GCCGAG, na tentativa de fornecer subsídios que possam distinguir estas lesões, que são histopatologicamente semelhantes. Para fins comparativos, serão incluídos casos de FOJ agressivos, lesões igualmente destrutivas dos ossos maxilares.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os parâmetros clínicos (sexo, idade, associação com dentes, tamanho, tempo de evolução, sintomatologia, localização e aspecto radiográfico) e a expressão imuno-histoquímica dos marcadores CD68, CD163, CD34, CD105, D2-40, p63, ciclina D1, Ki-67, SMA, DOG1, SHH e GLI1 em GCCG;

Avaliar se a expressão imuno-histoquímica dos marcadores CD68, CD163, CD34, CD105, D2-40, p63, ciclina D1, Ki-67, SMA, DOG1, SHH e GLI1 em GCCGNA e GCCGAG pode auxiliar na distinção entre estas duas variantes e compará-las com os FOJ;

Correlacionar a expressão imuno-histoquímica dos marcadores CD68, CD163, CD34, CD105, D2-40, p63, ciclina D1, Ki-67, SMA, DOG1, SHH e GLI1 entre si nos GCCGNA e GCCGAG;

Realizar uma regressão logística entre as expressões imuno-histoquímicas dos marcadores CD68, CD163, CD34, CD105, D2-40, p63, ciclina D1, Ki-67, SMA, DOG1, SHH e GLI1 e os dados clínicos nos GCCGNA e GCCGAG para verificar se existem fatores que podem ser considerados de risco ou de proteção destas lesões.

4 METODOLOGIA

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto desta pesquisa foi submetido na Plataforma Brasil e encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Enfermagem da Universidade Federal da Bahia, para a devida avaliação, e aprovação, sob o protocolo de número 66087817.1.1001.5531 e parecer número 2.014.366.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Esta pesquisa trata-se de um estudo transversal, descritivo e exploratório, que selecionou lesões com diagnóstico de GCCG através da coleta de dados clínicos da ficha de pacientes armazenados no banco de dados da Disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Propedêutica e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA) e da Disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). Foram selecionados 23 casos de GCCG e 04 casos de FOJ de pacientes que tiveram seus espécimes cirúrgicos analisados e diagnosticados pela Disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Propedêutica da FOUFBA e pela Disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Estomatologia da FOUSP. Todos os casos foram fixados em formol tamponado neutro 10% e processados seguindo rotinas histotécnicas para este fim.

Foram critérios para inclusão das lesões no trabalho: tecido biologicamente preservado e passível de análise microscópica, dados clínicos disponíveis e suficientes para classificá-los em GCCGNA e GCCGAG, bem como diagnóstico anatomopatológico de GCCG e FOJ. Definiu-se como critérios de exclusão: ausência de tecido biologicamente preservado, blocos de parafina com pouco material e dados clínicos não disponíveis ou incompletos para o fim proposto.

4.3 ESTUDO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO

Foram coletados os seguintes dados clínicos dos pacientes: sexo, idade (anos), associação com dentes, tamanho (mm), tempo de evolução (meses), sintomatologia,

localização e aspecto radiográfico. Todos os casos foram selecionados por um patologista experiente após avaliação das lâminas histológicas coradas com hematoxilina/eosina e confeccionadas na época da realização do estudo histopatológico. Após a seleção dos 23 casos de GCCG, a partir dos blocos parafinados, confeccionou-se 01 nova lâmina histológica por bloco, sendo corada com hematoxilina/eosina e avaliada pelo mesmo patologista experiente, de acordo com os critérios adotados pela OMS (2017) (EL-NAGGAR et al., 2017) e seguindo os critérios de inclusão e exclusão deste estudo. A classificação dos casos em GCCGNA e GCCGAG baseou-se em estudos prévios (CHUONG et al., 1986; DEWSNUP et al., 2008; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012), utilizando critérios disponibilizados na tabela 1.

Tabela 1. Características clínicas e radiográficas dos GCCGNA e GCCGAG.

Critérios	GCCGNA	GCCGAG
Primários	< 50mm de diâmetro	≥ 50mm de diâmetro
	Ausência de recorrência após enucleação e curetagem	Recorrência após enucleação e curetagem
Secundários	Crescimento lento (> 6 meses)	Crescimento rápido (< 6 meses)
	Ausência de reabsorção/deslocamento dentário	Presença de reabsorção/deslocamento dentário
	Ausência de perfuração de cortical	Presença de perfuração de cortical
	Ausência de sintomatologia associada à lesão	Presença de sintomatologia associada à lesão

Tabela adaptada dos estudos de Chuong et al. (1986), Dewsnup et al. (2008) e Peacock; Jordan; Schmidt (2012). Para serem classificadas como GCCGAG, as lesões deveriam apresentar um critério primário ou pelo menos três critérios secundários.

4.4 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Cortes de 3µm de espessura foram obtidos dos espécimes fixados em formol e emblocados em parafina, sendo dispostos em lâminas de vidro previamente limpas e silanizadas. Inicialmente foram efetuadas reações de padronização para determinar as melhores diluições, métodos de recuperação antigênica e tempo de incubação de cada anticorpo, conforme rotina do nosso grupo de pesquisa. A seguir, os casos foram

submetidos às reações imuno-histoquímicas referentes aos marcadores CD68, CD163, CD34, CD105, D2-40, p63, ciclina D1, Ki-67, SMA, DOG1, SHH e GLI1 de acordo com o protocolo de imuno-histoquímica do Laboratório de Patologia da FOUFBA. Dados sobre fabricante, clone, diluição, recuperação antigênica e controle positivo dos anticorpos estão descritos na tabela 2.

Após passagem pela estufa a 60 ° por 24 horas no dia anterior a reação, as secções histológicas seguiram para desparafinização em xilol e reidratação com álcool. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio 3% por 15 minutos (2x). Para exposição dos epítomos antigênicos, as secções foram submetidas à recuperação antigênica, em calor úmido ou através de estufa por 20 minutos, conforme descrito na tabela 2. Os anticorpos primários foram incubados overnight (18h) à temperatura de 4°C, com exceção do anticorpo p63, cuja incubação foi realizada no período de 01 hora.

Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram incubados com o sistema polimérico de amplificação Advance™ (Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA) por 30 minutos, com exceção da reação envolvendo a proteína CD34, quando foi utilizado o sistema polimérico de amplificação EnVision™ (Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA). As reações foram reveladas com o cromógeno DAB™ (3,3-diaminobenzidina, Dako, Carpinteria, CA, EUA), por 5 minutos, em câmara escura e, posteriormente, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto e montadas após desidratação com álcool e diafanização com xilol.

Após a realização das reações imuno-histoquímicas, as lâminas foram avaliadas por um examinador experiente utilizando o microscópio digital virtual Axio Lab.A1 (Zeiss, Alemanha, 2008), com um aumento de 400x. As imagens deste estudo foram captadas por uma câmera digital (AxioCam ICc3, Zeiss, Alemanha, 2008) e transferidas para um monitor de vídeo por um sistema computadorizado.

Tabela 2. Especificidade dos marcadores.

Anticorpo	Marca comercial	Clone	Controle positivo	Recuperação antigênica	Diluição
CD68	Dako	PGM1	Mucocele	EDTA pH 8,0 (95°C) - 20 minutos	1:100
CD163	Cell Marque	GHI/61	Mucocele	EDTA pH 8,0 (95°C) - 20 minutos	1:25
CD34	Dako	QBEND 10	Mucocele	Tripsina 1% (37°C) - 30 minutos	1:100
CD105	Dako	SN6h	Câncer de mama	Citrato pH 8,0 (95°C) - 20 minutos	1:30
D2-40	Dako	D2-40	CO	Citrato pH 6,0 (95°C) - 20 minutos	1:150
p63	Biosystems	7JUL	CEC	Citrato pH 6,0 (95°C) - 20 minutos	1:10
Ciclina D1	Dako	SP4	CO	Citrato pH 6,0 (95°C) - 20 minutos	1:50
Ki-67	Cell Marque	SP6	CEC	Citrato pH 6,0 (95°C) - 20 minutos	1:100
SMA	Dako	1A4	Mucocele	Citrato pH 6,0 (95°C) - 20 minutos	1:100
DOG1	Cell Marque	SP31	GIST	Citrato pH 8,0 (95°C) - 20 minutos	1:100
SHH	Novus Biologicals	5H4	Placenta	Citrato pH 6,0 (95°C) - 20 minutos	1:1000
GLI1	Novus Biologicals	Policlonal	Placenta	Citrato pH 6,0 (95°C) - 20 minutos	1:600

CEC = Carcinoma escamocelular; CO = Ceratosisto Odontogênico; GIST = *Gastrointestinal Stromal Tumor*.

Para avaliação imuno-histoquímica, os casos foram classificados de acordo com um escore de intensidade e proporção de marcações, baseados em critérios utilizados em trabalhos prévios (DULTRA et al., 2012; VIDAL et al., 2016). A intensidade de marcação foi classificada da seguinte maneira: 0 = ausência de marcação; 1 = marcação discreta; 2 = marcação moderada; 3 = marcação intensa. A proporção de células marcadas foi definida da seguinte maneira: 0 = 0 a 10%; 1 = 11 a 40%; 2 = 41 a 75%; 3 = 76 a 100%. Em seguida foi calculado o índice de marcação (IM) da seguinte forma: multiplicou-se o escore da intensidade de marcação (0 a 3) pelo escore da proporção de marcação (0 a 3). Por fim, de acordo com os valores obtidos, a expressão dos anticorpos foi classificada de acordo com o IM da seguinte maneira: expressão negativa (IM-) para $IM = 0$; baixa expressão (IM1+) para IM entre 1 e 5; alta expressão (IM2+) para $IM \geq 6$.

Para os anticorpos CD163, CD34, CD105 e D2-40, as células marcadas foram contadas ao invés de terem a proporção de marcação avaliada, seguindo o que é observado em outros estudos (FALCI et al., 2014; VARSHA et al., 2014; KAHN et al., 2017). As contagens foram realizadas manualmente e sob aumento de 400x após seleção aleatória de 10 campos com características evidentes das lesões estudadas. Para permitir a comparação com a proporção de células marcadas pelos demais anticorpos (representadas em porcentagem), os valores obtidos após a contagem foram transformados em porcentagem e classificados de acordo com os escores descritos anteriormente (0 = 0 a 10%; 1 = 11 a 40%; 2 = 41 a 75%; 3 = 76 a 100%), e multiplicados pelos respectivos escores de intensidade de marcação, semelhante ao que foi realizado por Vidal et al. (2016).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram compilados em um banco de dados organizado em planilhas do programa operacional *Microsoft Excel* e a análise estatística foi realizada utilizando o *Software Minitab versão 14[®]* (*Minitab Inc., Pennsylvania, USA*). Os dados foram analisados segundo a distribuição na curva normal de Gauss e, a partir da análise estatística descritiva destes (Média, Mediana e Desvio Padrão), foram aplicados testes paramétricos e não-paramétricos de acordo com a distribuição encontrada nos resultados e tamanho amostral.

Para identificar a associação entre os marcadores, características clínicas e tipo de lesão foram utilizados o teste exato de Fischer, teste do qui-quadrado e regressão logística univariada. Os testes de Kruskal-Wallis e ANOVA foram realizados para comparar as diferenças entre os grupos nas variáveis contínuas e a Correlação de Spearman, para correlacionar dois marcadores entre si. Todos foram realizados com nível de significância de 95% (valor de “p” menor ou igual a 5%).

5 RESULTADOS

5.1 ASPECTOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS GERAIS

A seguir serão descritas as características gerais das imunoexpressões apresentadas pelos casos selecionados neste estudo, sendo representadas por suas respectivas fotomicrografias (Figuras 1, 2 e 3).

5.1.1 CD68

De um modo geral, este marcador foi positivo em citoplasma de CG, embora alguns casos positivos em CM também foram observados, com marcação nuclear predominante (Figura 1A). Os casos de FOJ também apresentaram marcação em CG.

5.1.2 CD163

De um modo geral, houve imunopositividade predominantemente nuclear nas CM e, raramente houve marcação em CG (Figura 1B).

5.1.3 CD34

Houve predomínio de marcação nuclear e citoplasmática em microvasos colabados circundados por CG (Figura 1C). Nos FOJ, o estroma fibrocelular mostrou imunopositividade em numerosos vasos colabados ou não, e acompanhando diversos fascículos celulares.

5.1.4 CD105

Observou-se poucos microvasos com núcleo e citoplasma marcados distribuídos pelo estroma das lesões (Figura 1D).

5.1.5 D2-40

Houve marcação citoplasmática de CM, além de poucos vasos linfáticos, tanto nos GCCG (Figura 2B) como nos FOJ.

5.1.6 p63

Apenas raras CM, especialmente aquelas em mitose, mostraram imunopositividade nuclear para este marcador (Figura 2A).

5.1.7 Ciclina D1

Houve predomínio de marcação no núcleo das CG, embora raras CM também apresentassem imunopositividade para este marcador (Figura 2C). Nos casos de FOJ foi possível observar imunopositividade especialmente em CM, embora CG também estivessem marcadas.

5.1.8 Ki-67

Houve rara marcação em CM, com predomínio nuclear e por vezes sob a forma de pequenos acúmulos focais (Figura 2D).

5.1.9 SMA

As CM ovulares e fusiformes mostraram marcação positiva ao SMA, sendo predominantemente citoplasmática. Nas CG, núcleos e/ou citoplasma por vezes também foram positivos para este marcador. As áreas de fibrose permeando ou na periferia de CG também apresentaram positividade (Figura 3A). Os casos de FOJ apresentaram marcação nuclear e, por vezes, citoplasmática em células estromais.

5.1.10 DOG1

Não houve marcação membranar, embora tenha havido marcação citoplasmática em algumas CG, que foi considerada inespecífica.

5.1.11 SHH

De um modo geral, marcou citoplasma das CM e CG. Eventualmente, alguns casos apresentaram apenas marcação citoplasmática em CG (Figura 3B). De forma similar, os casos de FOJ apresentaram marcação citoplasmática em células estromais e CG.

5.1.12 GLI1

A expressão do GLI1 foi variável, ora marcando CM, ora marcando CG, especialmente citoplasma, ou ambos (Figura 3C). Nos FOJ, houve imunopositividade em citoplasma de CM e núcleos de CG.

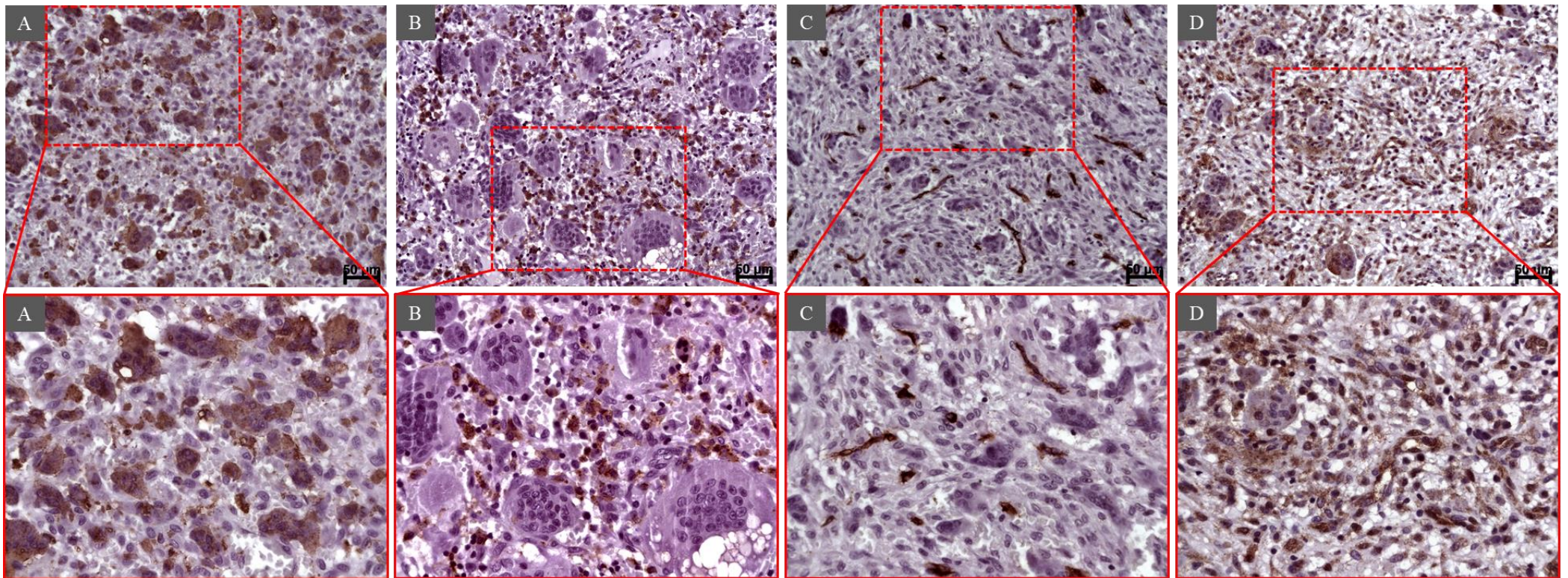


Figura 1. Expressão imuno-histoquímica em GCCG. (A) Podemos observar expressão citoplasmática em CG com raras CM apresentando núcleos imunopositivos para o CD68. (B) Notar ausência de expressão em CG e expressão nuclear predominante em CM para o CD163. (C) Pode-se observar microvasos colabados apresentando imunopositividade para o CD34 em meio à CG. (D) Observar imunopositividade para o CD105 em microvasos colabados ou não.

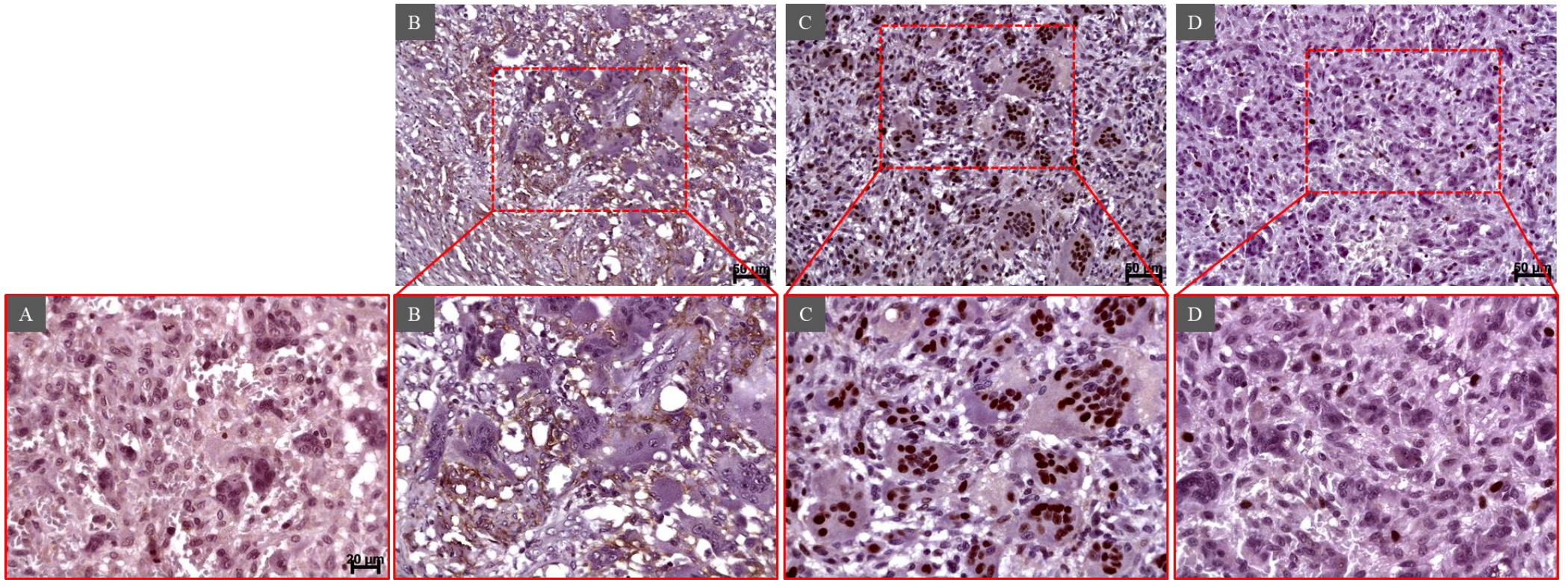


Figura 2. Expressão imuno-histoquímica em GCCG. (A) Notar discreta expressão nuclear em algumas CM, especialmente aquelas em mitose, para o p63. (B) Podemos observar moderada expressão para o D2-40 em microvasos não colabados. (C) Observar intensa marcação nuclear em CG, com raras CM imunopositivas para a ciclina D1. (D) Pode-se observar algumas CM dispersas em meio ao estroma tumoral marcadas para o Ki-67.

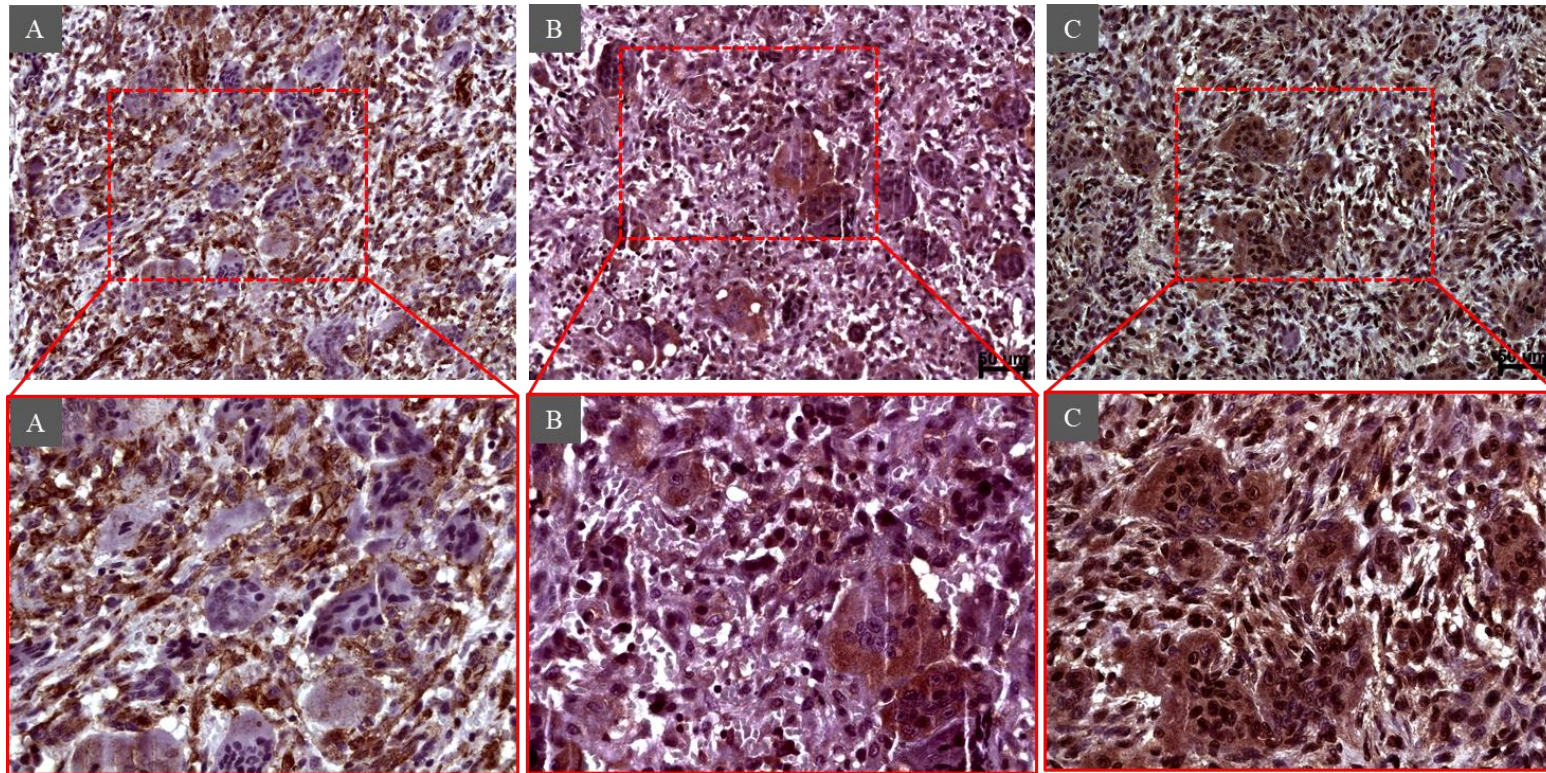


Figura 3. Expressão imuno-histoquímica em GCCG. (A) Estroma composto por CM ovulares e, predominantemente, fusiformes com intensa marcação nuclear e citoplasmática para o SMA. (B) Notar expressão nuclear e citoplasmática para o SHH em CM e expressão, predominantemente, citoplasmática em CG. (C) Observar intensa marcação nuclear tanto em CM quanto em CG para o GLI1, que também marcou, de forma menos intensa, citoplasma de CG.

5.2 DADOS CLÍNICOS

A tabela 3 descreve as características clínicas dos GCCG, onde podemos observar maior prevalência destas lesões no sexo feminino em relação ao sexo masculino (74% e 26%, respectivamente), sem diferenças estatísticas entre GCCGNA e GCCGAG ($p > 0,05$ - teste qui-quadrado). A média de idade foi de 33,55 anos ($DP = \pm 17,2$), sendo que os GCCGAG apresentaram menor média de idade (29,18 anos; $DP = \pm 16,44$) em relação aos GCCGNA (37,91 anos; $DP = \pm 17,78$), porém esta diferença não apresentou significância estatística ($p > 0,05$ - One-way ANOVA). Com relação à associação com dentes (reabsorção ou deslocamento dentários), as lesões agressivas apresentaram associação significativamente maior do que as lesões não agressivas ($p = 0,047$ - teste qui-quadrado). O tamanho médio dos GCCG foi de 35,95mm ($DP = \pm 9,69$) em seu maior diâmetro, sendo que as lesões agressivas apresentaram um tamanho médio (57,86mm; $DP = \pm 6,99$) significativamente maior ($p = 0,000$ - One-way ANOVA) do que as lesões não agressivas (23,17mm; $DP = \pm 10,88$).

A tabela 3 mostra ainda que os GCCG apresentaram um tempo médio de evolução de 13,31 meses ($DP = \pm 15,87$), sendo menor nos GCCGAG (12,63 meses; $DP = \pm 12,41$) quando comparado aos GCCGNA (14,50 meses; $DP = \pm 18,70$), porém não houve significância estatística ($p > 0,05$ - One-way ANOVA). Na maioria dos casos de GCCG (52,17%), não houve relato de sintomatologia associada à lesão, porém a maioria (72,73%) dos casos de lesões agressivas apresentaram sintomatologia associada, em contraste com os casos de lesões não agressivas (27,27%), resultando em significância estatística ($p = 0,03$ - teste qui-quadrado). A mandíbula foi mais acometida do que a maxila (78,26% e 21,74%, respectivamente), porém sem diferença estatisticamente significante entre GCCGNA e GCCGAG ($p > 0,05$, teste qui-quadrado). Em contrapartida, o aspecto radiográfico apresentou significância estatística ($p = 0,020$ - teste qui-quadrado) na comparação entre as duas variantes, quando 40% dos GCCGAG apresentaram aspecto radiográfico misto ou predominantemente radiopaco e nenhum caso de GCCGNA apresentou estes tipos de imagens radiográficas.

Tabela 3. Dados clínicos dos GCCG.

		GCCG (n = 23)	GCCG NA (n = 12)	GCCG AG (n = 11)	p (valor)
Sexo	Feminino	17 (74%)	9 (75%)	8 (73%)	0,72
	Masculino	6 (26%)	3 (25%)	3 (27%)	
Idade (anos)	ND	1	1	-	0,246
	Média	33,55	37,91	29,18	
	DP	± 17,12	± 17,78	± 16,44	
	Amplitude	10 - 72	16 - 72	10 - 67	
Associação com dentes	ND	8 (35%)	6 (50%)	2 (18%)	0,047*
	Sim	9 (39%)	2 (17%)	7 (64%)	
	Não	6 (26%)	4 (33%)	2 (18%)	
Tamanho (mm)	ND	4	-	4	0,000*
	Média	35,95	23,17	57,86	
	DP	± 9,69	± 10,88	± 6,99	
	Amplitude	3 - 70	3 - 45	50 - 70	
Tempo de evolução (meses)	ND	7	4	3	0,817
	Média	13,31	14,50	12,63	
	DP	± 15,87	± 18,70	± 12,41	
	Amplitude	3 - 60	3 - 60	4 - 36	
Sintomatologia	ND	1 (4%)	1 (8%)	-	0,03*
	Sim	10 (44%)	2 (17%)	8 (73%)	
	Não	12 (52%)	9 (75%)	3 (27%)	
Localização	Maxila	5 (22%)	3 (25%)	2 (18%)	0,692
	Mandíbula	18 (78%)	9 (75%)	9 (82%)	
Aspecto radiográfico	ND	2	1	1	0,020*
	Radiolúcido	17 (81%)	11 (100%)	6 (60%)	
	Radiopaco/Misto	4 (19%)	0 (0%)	4 (40%)	

ND = Informação não disponível; DP = Desvio padrão; * Significância estatística.

5.3 EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

A tabela 4 mostra a comparação do IM entre os GCCGNA, GCCGAG e FOJ. Pode-se observar que os casos de FOJ apresentaram alta expressão para o CD34 significativamente maior do que os GCCG ($p = 0,00$ - teste qui-quadrado), que apresentaram alta expressão em aproximadamente metade dos casos. Além disso, os GCCGAG mostraram alta expressão para o GLI-1 significativamente maior ($p = 0,03$ - teste qui-quadrado) quando comparados aos FOJ, que tiveram todos os casos apresentando baixa expressão para este marcador. Não houve significância estatística ao comparar o IM dos marcadores CD68, CD163, CD105, D2-40, p63, ciclina D1 Ki-67, SMA, DOG1 e SHH entre os GCCGNA, GCCGAG e FOJ ($p > 0,05$ - teste qui-quadrado).

Tabela 4. Comparação do IM entre GCCGAG, GCCGNA e FOJ.

		GCCGNA (n = 12)	GCCGAG (n = 11)	FOJ (n = 4)	p (valor)
CD68	IM1+	0	1	1	0,63
	IM2+	11	10	-	
CD163	IM1+	6	5	-	0,29
	IM2+	3	5	-	
CD34	IM1+	6	5	-	0,00*
	IM2+	6	5	4	
CD105	IM1+	2	3	1	0,73
	IM2+	1	2	1	
D2-40	IM1+	2	4	1	0,53
	IM2+	5	6	-	
p63	IM1+	-	-	-	-
	IM2+	-	-	-	
Ciclina D1	IM1+	3	6	2	0,55
	IM2+	5	2	-	
Ki-67	IM1+	-	-	-	-
	IM2+	-	-	-	
SMA	IM1+	1	-	-	0,98
	IM2+	11	11	4	
DOG1	IM1+	-	-	-	-
	IM2+	-	-	-	
SHH	IM1+	3	5	2	0,56
	IM2+	4	4	2	
GLI-1	IM1+	6	3	4	0,03**
	IM2+	6	6	-	

*Diferença estatisticamente significativa entre GCCG e FOJ; ** Diferença estatisticamente significativa entre GCCGAG e FOJ.

5.4 CORRELAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

A tabela 5 mostra os resultados, que apresentaram significância estatística, após as correlações de Pearson entre os marcadores em GCCGNA e GCCGAG. Podemos observar que para os GCCGNA houve correlação negativa estatisticamente significativa entre SMA x SHH ($p = 0,031$) e CD34 x GLI1 ($p = 0,05$). Ainda com relação aos GCCGNA, houve correlação positiva estatisticamente significativa entre SHH x GLI1 ($p = 0,040$). Nos casos de GCCGAG, houve correlações positivas estatisticamente significantes entre CD68 x CD163 ($p = 0,031$), CD34 x D2-40 ($p = 0,04$), D2-40 x Ciclina D1 ($p = 0,040$), D2-40 x SMA ($p = 0,027$) e GLI1 x Ciclina D1 ($p = 0,030$). Houve apenas

uma correlação negativa estatisticamente significativa em GCCGAG, que foi entre CD105 x CD68 ($p = 0,040$). Todas as demais correlações realizadas no presente estudo não apresentaram significância estatística.

Tabela 5. Correlações entre os IM dos marcadores em GCCGNA e GCCGAG.

Correlações	GCCGNA		GCCGAG	
	R ²	<i>p</i> (valor)	R ²	<i>p</i> (valor)
CD68 X CD163	0,388	0,213	0,484	0,031*
CD34 X D2-40	0,357	0,254	0,481	0,04*
CD34 X GLI1	-0,540	0,050*	-0,123	0,718
CD105 X CD68	0,257	0,445	-0,625	0,040*
D2-40 X Ciclina D1	0,008	0,980	0,470	0,045*
D2-40 X SMA	0,012	0,971	0,660	0,027*
SMA X SHH	-0,462	0,031*	0,152	0,656
SHH X GLI1	0,598	0,040*	0,429	0,088
GLI1 X Ciclina D1	0,248	0,436	0,653	0,030*

* Correlações que apresentaram significância estatística.

5.4 REGRESSÃO LOGÍSTICA

A tabela 6 apresenta os resultados da regressão logística das variáveis estudadas nesta pesquisa (marcadores e dados clínicos) com os GCCG, sendo os resultados interpretados como fatores de risco ou proteção para os GCCGAG. Apenas a variável sintomatologia associada à lesão apresentou significância estatística como fator de risco para os GCCGAG (OR = 12,00 / $p = 0,016$). As variáveis CD163, CD105, D2-40, SHH, GLI1, idade (≤ 30 anos), associação com dente, localização (mandíbula) e tempo de evolução (≤ 6 meses) não apresentaram significância estatística ($p > 0,05$) como fatores de risco. O mesmo ocorreu com as variáveis CD68, CD34, Ciclina D1 e sexo (feminino),

que não apresentaram significância estatística ($p > 0,05$) como fatores de proteção para os GCCGAG.

Tabela 6. Regressão logística univariada entre variáveis e GCCG.

Variável	Coefficiente	OR	Limite mínimo	Limite máximo	<i>p</i> (valor)
CD68	1,48017	0,91	0,05	16,54	0,949
CD163	0,900616	2,50	0,43	14,61	0,309
CD34	0,836660	0,83	0,16	4,3	0,827
CD105	1,30809	2,22	0,17	28,86	0,542
D2-40	0,842332	1,68	0,32	8,76	0,538
Ciclina D1	0,976713	0,31	0,05	2,11	0,232
SMA *	-	-	-	-	-
SHH	0,876275	1,14	0,21	6,37	0,879
GLI1	0,83660	1,20	0,23	6,19	0,827
Sexo (feminino)	0,950146	0,89	0,14	5,72	0,901
Idade (≤ 30 anos)	0,988826	5,40	0,78	37,51	0,088
Associação com dente	1,18019	7,00	0,69	70,75	0,099
Localização (mandíbula)	1,02740	1,50	0,20	11,24	0,693
Tamanho (≥ 50 mm) *	-	-	-	-	-
Sintomatologia associada	1,03413	12,00	1,58	91,09	0,016
Aspecto radiográfico (radiopaco ou misto) *	-	-	-	-	-
Tempo de evolução (≤ 6 meses)	1,03279	2,78	0,37	21,03	0,323

OR = Odds Ratio. * Variáveis não se ajustaram ao modelo de regressão logística.

6 DISCUSSÃO

O Granuloma Central de Células Gigantes (GCCG) é uma lesão intraóssea benigna dos maxilares relativamente incomum e de etiologia desconhecida (FLÓREZ-MORENO et al., 2008). Apresenta características osteolíticas de limites bem definidos, sendo composta por CG tipo osteoclastos dispostas em um estroma vascular, que pode apresentar características agressivas (EL-NAGGAR et al., 2017). Apesar desta definição, alguns autores discordam se estas lesões deveriam ser consideradas neoplasias verdadeiras ou se seriam processos reativos (ITONAGA et al., 2003; POGREL, 2003; REGEZI; POGREL, 2004; KUJAN et al., 2015).

Para melhor compreender esta divergência, acredita-se que as células fusiformes recrutem monócitos e induzam a sua diferenciação em CG tipo osteoclastos, através da liberação de citocinas (TIFFEE; AUFDEMORTE, 1997; NAGASAWA et al., 2002; ITONAGA et al., 2003). Dentre estas citocinas, destacam-se: IL-1 (AHMED; DUNLAP, 2016), IL-4 (AGHBALI et al., 2017), IL-12, IFN- γ , M-CSF (SYRIO et al., 2011; AHMED; DUNLAP; 2016), RANKL (LIU; YU; LI, 2003; AHMED; DUNLAP; 2016), VEGF, TNF- α e TGF- β (DE MATOS et al., 2012). Estas citocinas estão envolvidas em diversas vias que promovem a diferenciação de CM em CG ou na ativação e diferenciação de CG para um fenótipo osteoclástico. A diferenciação de CM em osteoclastos e a fusão destes para formar as CG é iniciada pela ação das citocinas IL-1 e M-CSF, que culmina na ativação do RANKL, uma importante proteína responsável pela remodelação óssea (AHMED; DUNLAP; 2016). A detecção desta via em lesões com histopatogênese semelhante, pode auxiliar no desenvolvimento de novas drogas, como o Denosumab, um inibidor da RANKL (NAIDU et al., 2014; SCHREUDER et al., 2014; GUPTA et al., 2015; O'CONNELL et al., 2015; BREDELL et al., 2017), permitindo a realização de tratamentos menos invasivos.

Apesar das CG representarem a principal característica dos GCCG, são as CM fusiformes, o componente proliferativo destas lesões (TIFFEE; AUFDEMORTE, 1997; NAGASAWA et al., 2002; ITONAGA et al., 2003). Por outro lado, a presença de células vermelhas extravasadas é abundante em alguns GCCG, apesar destes tumores não serem fundamentalmente tumores vasculares, ou seja, as células endoteliais não são o seu componente proliferativo (O'MALLEY et al., 1997). A razão para o extravasamento destas células vermelhas pode estar relacionada à permeabilidade vascular promovida

através da liberação de citocinas pelas CM fusiformes. Estes eventos podem estar associados à expressão do VEGF, que está associado à angiogênese e osteoclastogênese (ZHENG et al., 2000) e já foi identificado em GCCG (DE MATOS et al., 2011; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012).

A despeito destas divergências, os GCCG são classificados em agressivos e não agressivos. De maneira geral estas duas variantes são semelhantes histologicamente, o que torna necessário a utilização de parâmetros clínicos e radiográficos capazes de auxiliar na diferenciação destes dois tipos de comportamentos pertencentes ao mesmo tipo de lesão. Para tanto, Chuong et al. (1986) e Peacock; Jordan; Schmidt et al. (2012) propuseram alguns parâmetros a serem utilizados na determinação das lesões agressivas e não agressivas, que são citados a seguir: presença de sintomatologia dolorosa, taxa de crescimento (rápida ou lenta), tamanho da lesão (menor ou maior do que 5,0 cm), reabsorção/deslocamento dentário, perfuração de cortical e recorrência.

As lesões agressivas são caracterizadas por presença de sintomatologia dolorosa, reabsorção ou deslocamento dentário, perfuração de cortical e invasão de tecidos adjacentes (VERED; BUCHNER; DAYAN, 2008). De acordo com o que é observado em outros estudos (VERED; BUCHNER; DAYAN, 2008), apesar de existir grande variação na proporção entre GCCGNA e GCCGAG, cerca de 30% são classificados como agressivos. No presente estudo, 48% dos GCCG foram classificados como agressivos.

Apesar do fato de não existirem diferenças histopatológicas entre as lesões agressivas e não agressivas (CHUONG et al., 1986; O'MALLEY et al., 1997), alguns estudos afirmam que os GCCGAG são mais vascularizados e apresentam maior nível de angiogênese quando comparados com as GCCGNA (KABAN et al., 1999; SOUZA et al., 1999; KABAN et al., 2002; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012; VARSHA et al., 2014). Outros autores (CHUONG et al., 1986; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; SARODE; SARODE, 2014) relatam ainda existirem outras diferenças histológicas entre as lesões agressivas e não agressivas, quando as primeiras possuiriam diversas CG maiores, com maior quantidade de núcleos, distribuídas uniformemente e ocupando uma maior área das lesões. Kruse-lösler et al. (2006) relatam que o número de mitoses nas lesões agressivas é significativamente maior do que nas lesões não agressivas. Sarode; Sarode (2014) afirmam ainda que as lesões agressivas e recorrentes apresentam um número significativamente maior de canibalismo celular, o que poderia auxiliar na determinação do comportamento biológico do tumor. O real motivo destes comportamentos clínicos

distintos ainda é desconhecido. No entanto, é propósito nosso estudar estes aspectos em um futuro próximo.

Quanto aos aspectos clínicos, nossos resultados revelaram que as mulheres foram quase três vezes mais acometidas pelo GCCG quando comparadas aos homens, o que está de acordo com o que é constatado por outros estudos, mesmo que em menores proporções (WHITAKER; WALDRON, 1993; KAFFE et al., 1996; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; DE LANGE; VAN DEN AKKER; VAN DEN BERG, 2007; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012). Este fato pode ser influenciado pela maior procura do gênero feminino pelos serviços de saúde no Brasil (RIBEIRO et al., 2006; LEVORATO et al., 2014). Além disso, não observamos diferenças estatisticamente significantes entre os sexos feminino e masculino ao comparar os GCCGNA e GCCGAG, o que também está de acordo com o que é observado em estudos prévios (KRUSE-LÖSLER et al., 2006; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012).

A idade média dos pacientes acometidos pelo GCCG ficou dentro da quarta década de vida, diferentemente do que é observado na maioria dos outros trabalhos, nos quais a idade média encontra-se na segunda ou terceira décadas de vida (WHITAKER; WALDRON, 1993; DE LANGE; VAN DEN AKKER, 2005; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; VAN DEN AKKER; VAN DEN BERG, 2007; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012; FLANAGAN; SPEIGHT, 2014). Apesar de não ter havido significância estatística, pacientes mais jovens foram mais acometidos pelos GCCGAG, o que está de acordo com o que é relatado por outros autores (CHUONG et al., 1986; WHITAKER; WALDRON, 1993; O'MALLEY et al., 1997; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012). A amostra heterogênea com ampla faixa etária, observada no nosso estudo, influenciou o fato de não ter havido significância estatística neste quesito.

As lesões agressivas estiveram significativamente mais associadas com dentes, resultado que é similar ao encontrado em outros estudos (KRUSE-LÖSLER et al., 2006; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012), que por vezes dividem esta associação entre reabsorção e deslocamento dentários (KRUSE-LÖSLER et al., 2006; DE LANGE; VAN DEN AKKER; VAN DEN BERG, 2007; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012). Esta dissociação não foi passível de ser realizada neste trabalho por falta de informações disponíveis nos prontuários avaliados.

Os GCCGAG apresentaram tamanho médio significativamente maior do que os GCCGNA, corroborando o que está estabelecido em estudos prévios (CHUONG et al., 1986; BARNES et al., 2005; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012). Esta característica é influenciada pelo fato deste ser o principal critério utilizado para classificar as lesões em agressivas e não agressivas, de acordo com o que é descrito por Peacock; Jordan; Schmidt et al. (2012), que realizaram pequenas alterações nos critérios estabelecidos por Chuong et al. (1986). Pelo fato de possuírem maiores dimensões, os GCCGAG acabam apresentando, por vezes, alto potencial destrutivo dos ossos gnáticos (DE LANGE; VAN DEN AKKER; VAN DEN BERG, 2007; SUN et al., 2009).

Nós observamos que, mesmo sem haver significância estatística, o tempo de evolução médio dos GCCG até o tratamento da lesão foi menor na variante agressiva do que na variante não agressiva, o que pode ser explicado pelo fato desta variante possuir tamanho médio maior, maior associação com dentes e algum tipo de sintomatologia associada à lesão, facilitando, desta forma, a sua percepção mais precoce. Este menor tempo de evolução, ou rápido crescimento, também é descrito por outros autores (CHUONG et al., 1986; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012).

Os casos de GCCGNA apresentaram significativamente menos sintomatologia associada à lesão do que os GCCGAG, o que faz sentido, já que supõe-se que lesões agressivas provoquem maiores destruições dos ossos gnáticos. Estudos prévios apresentam resultados similares aos nossos (O'MALLEY et al., 1997; BARNES et al., 2005; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012). Por este motivo, a sintomatologia associada à presença da lesão é um dos critérios utilizados para classificação dos GCCG (CHUONG et al., 1986; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012). Dentro do modelo de regressão logística univariada utilizado no presente estudo, esta variável foi a única que apresentou resultado significativo ao comparar os GCCGAG com os GCCGNA. A sintomatologia associada à lesão representou um fator de risco doze vezes maior para os GCCGAG. Todas as demais variáveis (marcadores e dados clínicos) deste modelo de regressão não apresentaram significância estatística, fortalecendo a associação da presença de sintomatologia com as lesões agressivas.

Nossos resultados revelaram uma prevalência quase quatro vezes maior em mandíbula do que em maxila, sem que houvesse diferenças estatisticamente significantes

entre os GCCGNA e GCCGAG, similar ao que é encontrado em outros estudos, mesmo com proporções distintas (WHITAKER; WALDRON, 1993; KAFFE et al., 1996; O'MALLEY et al., 1997; DE LANGE; VAN DEN AKKER; KLIP, 2004; DE LANGE; VAN DEN AKKER, 2005; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012). Não foi possível determinar as regiões mais acometidas tanto em maxila quanto em mandíbula por falta de dados suficientes disponíveis, porém alguns autores têm referido a região anterior como sendo o local de maior prevalência dos GCCG, com a particularidade de haver o cruzamento da linha média por boa parte destas lesões (WHITAKER; WALDRON, 1993; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2008; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012).

Quanto ao aspecto radiográfico, houve significância estatística no que diz respeito ao fato de que as lesões agressivas apresentaram um aspecto radiográfico misto ou predominantemente radiopaco em 40% dos casos, o que poderia contribuir de maneira relevante para auxiliar na diferenciação entre as duas variantes clínicas dos GCCG. Porém, ao nosso conhecimento, os estudos sobre GCCG não comparam a radiopacidade ou radiolcidez das lesões entre as variantes não agressivas e agressivas. As características radiográficas mais relatadas são a associação com dentes (KRUSE-LÖSLER et al., 2006; DE LANGE; VAN DEN AKKER; VAN DEN BERG, 2007; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012), discutida anteriormente, e os aspectos unilocular ou multilocular, que apresentam ampla variação, a depender da amostra estudada (WHITAKER; WALDRON, 1993; KAFFE et al., 1996; DE LANGE; VAN DEN AKKER; VAN DEN BERG, 2007). Por falta de dados suficientes disponíveis, os aspectos uni e multilocular das lesões não puderam ser avaliados no presente estudo.

6.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Com relação aos marcadores de macrófagos avaliados neste estudo, o CD68 é, quando comparado ao CD163, menos específico, uma vez que sua expressão não distingue os subtipos de macrófagos (FUJII et al., 2012; KONG et al., 2013; HE et al., 2014) e também pode ser observada em outras células fagocitárias (KAMPER et al., 2011; BARROS et al., 2013; KONG et al., 2013; PEDERSEN et al., 2014). Os macrófagos do tipo M1 são considerados agentes pró-inflamatórios e ainda possuem função antitumoral, enquanto os macrófagos do tipo M2 são considerados supressores inflamatórios, que participam do processo de reparação tecidual e podem promover a progressão tumoral

através de estímulos angiogênicos (BARROS et al., 2013; HE et al., 2014; PEDERSEN et al., 2014; TAKEYA E KOMOHARA, 2016). O CD163, receptor presente apenas em monócitos e macrófagos, está relacionado, principalmente, com funções anti-inflamatórias, caracterizando a presença do fenótipo M2 (KAMPER et al., 2011; BARROS et al., 2013; KONG et al., 2013; PEDERSEN et al., 2014).

Com relação à expressão destes marcadores neste estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre GCCGNA, GCCGAG e FOJ, apesar dos casos de FOJ apresentarem expressão negativa na maioria dos casos. Como era de se esperar, os GCCG apresentaram maior expressão para o CD68 do que para o CD163. Houve ainda correlação positiva significativa entre a expressão destes marcadores em GCCGAG, ou seja, a maior expressão frente ao CD68 correspondeu à uma maior expressão frente ao CD163. Esta correlação positiva lógica também ocorreu em GCCGNA, porém não houve significância estatística. Dentre os estudos que avaliaram a expressão do CD68 em GCCG (CARVALHO et al., 1995; O'MALLEY et al., 1997; TORABINIA; RAVAZI; SHOKROLAHI, 2011; VARSHA et al., 2014; KUJAN et al., 2015; KUMAR et al., 2016; KAHN et al., 2017), a maioria (CARVALHO et al., 1995; TORABINIA; RAVAZI; SHOKROLAHI, 2011; VARSHA et al., 2014; KUJAN et al., 2015; KUMAR et al., 2016) realizou comparações entre GCCG e granulomas periféricos de células gigantes (GPCG), quando foi possível observar que tanto as CG quanto as CM apresentaram imunopositividade para o CD68, resultados semelhantes aos encontrados no nosso estudo.

Torabinia; Ravazi; Shokrolahi (2011) sugerem que as CM apresentam características histiocitárias, ou seja, características de células precursoras de macrófagos, corroborando o que já havia sido sugerido anteriormente por outros autores (CARVALHO et al., 1995; TIFEE; AUFDEMORTE, 1997). Torabinia et al. (2011) afirmaram ainda que as CG possuem fenótipo osteoclástico baseado na imunopositividade destas para um marcador específico de osteoclastos, o que também estaria de acordo com o que é descrito por outros autores (BONETTI et al., 1990; TIFEE; AUFDEMORTE, 1997; ITONAGA et al., 2003; LIU; YU; LI, 2003).

Outra questão que parece encaminhar para um consenso é a hipótese de que as CG podem ser formadas pela fusão de CM (TIFEE; AUFDEMORTE, 1997; EL-MOFTY, 2002; TORABINIA; RAVAZI; SHOKROLAHI, 2011). Este fato auxiliaria na compreensão do motivo pelo qual as CM dos GCCG apresentaram imunopositividade para o CD163, enquanto as CG praticamente não apresentaram imunoexpressão para este

marcador. A imunonegatividade das CG para este marcador poderia ser explicada pelo fato das CM, precursoras das CG, possuírem o fenótipo M1 ou que durante o processo de formação das CG, poderia haver perda do fenótipo M2.

Kahn et al. (2017) foram os únicos autores a avaliarem a expressão do CD163 em GCCG previamente ao presente estudo e observaram imunopositividade das CG para o CD163. Esta discrepância de resultados pode ser explicada pelo fato de terem sido utilizados diferentes clones no desenvolvimento das reações imuno-histoquímicas, influenciando os resultados. Além disso, estes autores concluíram que apesar dos macrófagos CD163 positivos estarem relacionados à manutenção da agressividade em tumores (DAYAN et al., 2012; RIES et al., 2014), sua alta expressão foi considerada um fator preditor de GCCGNA. Entretanto, nossos resultados não corroboram os resultados destes autores, pois observamos que a maior expressão para o CD163 representaria um maior risco para os GCCGAG, apesar de não ter havido significância estatística no modelo de regressão logística utilizado.

Para elucidar a questão descrita anteriormente, Kahn et al. (2017) discutem que o CD163 foi descrito originalmente como um receptor dos complexos de hemoglobina-haptoglobina presentes em histiócitos e macrófagos (KRISTIANSEN et al., 2001; VAN GORP; DELPUTTE; NAUWYNCK, 2010). A principal função destas células é a degradação da hemoglobina (KRISTIANSEN et al., 2001; VAN GORP; DELPUTTE; NAUWYNCK, 2010), considerada tóxica quando não degradada rapidamente em bilirrubina e ferro no interior dos macrófagos (KRISTIANSEN et al., 2001). Kahn et al. (2017) sugerem ainda que devido ao seu papel no metabolismo da hemoglobina, a presença de macrófagos CD163 positivos em áreas focais de hemorragias, com extravasamento de eritrócitos ou depósitos de hemossiderina, pode ser explicada. O fato das CG CD163 positivas terem sido consideradas um fator protetivo e associados aos GCCGNA, reside na hipótese de que uma vez formadas as áreas de hemorragia, estas células poderiam estar atuando de forma efetiva no metabolismo das hemoglobinas liberadas. Por outro lado, a formação de áreas hemorrágicas em GCCGAG poderia ocorrer em um ritmo maior do que a habilidade dos macrófagos CD163 se acumularem e desempenharem suas funções de degradação da hemoglobina.

Para avaliação do padrão vascular neste estudo, foram utilizados os marcadores vasculares CD34, CD105 (endogлина) e D2-40 (podoplanina), proteínas capazes de identificar antígenos de mesmo nome presentes em células endoteliais vasculares

(PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012; FALCI et al., 2014), células endoteliais de vasos sanguíneos neoformados (CHEIFETZ et al., 1992) e em células endoteliais de vasos linfáticos (KAHN; MARKS, 2002), respectivamente. Após a avaliação das marcações imuno-histoquímicas, pôde-se observar que praticamente todos os casos de GCCG apresentaram baixa ou alta expressão para o marcador CD34, sugerindo que o componente vascular destas lesões representa um importante fator para sua composição estromal, corroborando o que é observado em estudos prévios (DEWSNUP et al., 2008; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2008; SUSARLA et al., 2009; TORABINIA; RAVAZI; SHOKROLAHI, 2011; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012; FLANAGAN; SPEIGHT, 2014).

Não foi possível, porém, observar diferenças significantes de expressão dos marcadores vasculares entre GCCGNA e GCCGAG, estando de acordo com os resultados apresentados por O'Malley et al. (1997) e Peacock; Jordan; Schmidt (2012). Em contrapartida, foi observada significância estatística ao comparar os casos de FOJ com os casos de GCCG, quando os primeiros apresentaram maior nível de vascularização de acordo com a avaliação da imunoexpressão frente ao CD34. Nossos resultados demonstraram ainda, que houve correlação negativa entre a expressão dos marcadores CD105 e CD68 em GCCGAG, o que pode ser explicado pelo fato de que a presença cada vez maior de vasos neoformados, associados ao reparo tecidual, culminaria na diminuição da quantidade de macrófagos com fenótipo M1, mais relacionados com processos pró-inflamatórios.

Alguns estudos (DEWSNUP et al., 2008; SUSARLA et al., 2009; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012) relatam que os GCCGAG apresentam maior grau de vascularização quando comparados aos GCCGNA, o que estaria condizente com o curso clínico destas lesões. Dewsnup et al. (2008) e Susarla et al. (2009) avaliaram a expressão do CD34 em GCCGNA e GCCGAG em uma mesma amostra, composta por um número de casos de GCCGAG aproximadamente quatro vezes maior do que o número de casos de GCCGNA (26 e 6, respectivamente), o que pode ter influenciado seus resultados. Apesar disso, Susarla et al. (2009) concluíram que uma porcentagem de marcação para o CD34 acima de 2,5% seria preditora dos GCCAG. Com relação aos resultados apresentados pelo estudo de Peacock; Jordan; Schmidt (2012), não houve significância estatística para a imunoexpressão do CD34 entre os GCCGNA e GCCGAG, porém os autores concluíram que os GCCGAG apresentaram maior nível de vascularização e

angiogênese, pois também avaliaram a expressão de outros marcadores (VEGF, bFGF e CD31) nestas lesões.

Vale ressaltar que ainda não está estabelecido se os GCCG são neoplasias verdadeiras ou lesões reativas, o que poderia explicar o fato do nível de angiogênese destas lesões não ser considerado diretamente proporcional ao nível de agressividade. Diante deste quadro, não houve diferenças significantes de expressão do CD105 entre GCCG e FOJ. Além disso, a expressão para este marcador foi menor tanto em GCCG quanto em FOJ, o que pode ser explicado pelo fato de que a maioria dos vasos sanguíneos presentes nestas lesões serem considerados antigos, ou seja, o grau de angiogênese seria considerado baixo (FERRARA, 2004; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006). Não houve diferenças significantes de expressão do CD105 entre os GCCGNA e GCCGAG. Segundo Vered; Buchner; Dayan (2006) o processo de angiogênese presente em GCCG encontra-se em baixos níveis, comprovado pelos menores níveis de imunexpressão das células endoteliais destas lesões frente aos VEGF e bFGF quando comparados com outros processos fisiológicos e patológicos, com participação vascular importante. Apenas o estudo de Falci et al. (2014), que comparou casos de GCCG com Granulomas Periféricos de Células Gigantes (GPCG), avaliou o marcador CD105 em GCCG, encontrando resultados semelhantes aos do presente estudo.

Com relação à expressão do marcador D2-40, dez casos (91%) de GCCGAG apresentaram alta ou baixa expressão, em contraste com sete casos (58%) de GCCGNA que também apresentaram alta ou baixa expressão, porém esta diferença não apresentou significância estatística. A comparação da expressão para este marcador entre GCCG e FOJ também não revelou resultados significantes. Ainda com relação ao D2-40, houve uma correlação positiva significativa entre ele e o CD34 em GCCGAG, indicando que uma maior presença de vasos sanguíneos estaria acompanhada de um maior número de vasos linfáticos nas lesões agressivas, apesar de estudos prévios não terem apresentado significância estatística para esta correlação (FALCI et al., 2014; SOUSA NETO et al., 2016). Não houve significância para esta correlação em GCCGNA.

Nossos resultados divergem dos apresentados por Falci et al (2014), pois estes autores observaram uma menor imunexpressão do D2-40 em relação ao CD105, enquanto nossos resultados revelaram o contrário, ou seja, nossos casos apresentaram maior expressão de vasos linfáticos do que de vasos neoformados, mesmo sem haver correlação significativa entre estes marcadores. Ademais, o papel desempenhado pelos

vasos linfáticos nos GCCG ainda necessita ser melhor estudado, pois Okamoto et al. (2010) tem relacionado a alta expressão deste marcador com o potencial invasivo local e progressão de tumores como o CO. Sousa Neto et al (2016) avaliaram a expressão do D2-40 em CO, cistos radiculares e folículos pericoronários e sugeriram que este marcador estaria mais associado com uma natureza neoplásica do que com o desenvolvimento dos cistos radiculares ou folículos pericoronários, devido ao fato das membranas e citoplasma celulares das células presentes na camada basal e suprabasal de CO terem apresentado intensa marcação para o D2-40.

Com relação à proteína p63, um gene de mesmo nome codifica dois grupos proteicos: TAp63, envolvida com o processo de apoptose, e Np63, importante para o processo de proliferação celular (YANG et al. 1998; LITTLE; JOCHEMSEN, 2002; BARBIERI; PIETENPOL, 2006), mas que pode atuar como oncogene (YANG et al. 1998; YANG et al. 2002; MILLS, 2006). No presente estudo, apenas raras CM, especialmente aquelas em mitose, mostraram imunopositividade para este marcador, o que fortalece que a proteína p63 também participa do processo de proliferação celular em GCCG, conforme descrito anteriormente. No entanto, diferente dos GCCG, os TCG apresentam imunopositividade para o p63 em CM (DICKSON et al., 2008; LEE et al., 2008; HAMMAS et al., 2012), o que torna estas duas lesões com comportamentos biológicos distintos, semelhantes histopatologicamente. Alguns autores acreditam que os GCCG e os TCG representam um mesmo processo patológico (KAUZMAN et al., 2004; KUJAN et al., 2015).

Desta forma, o p63 pode ser utilizado na diferenciação entre GCCG e TCG (DICKSON et al., 2008; LEE et al., 2008; HAMMAS et al., 2012), sendo que as CM também são o componente proliferativo dos TCG. Com relação aos GCCG, apesar de algumas CM terem apresentado imunopositividade para o p63, a sua expressão foi considerada negativa tanto em GCCG quanto em FOJ, não havendo, portanto, diferenças significantes entre estas lesões. A expressão negativa para o p63 em GCCG também é encontrada em outros estudos (DICKSON et al., 2008; LEE et al., 2008; HAMMAS et al., 2012). Além disso, nossos resultados não revelaram correlações significantes do p63 com os demais marcadores.

A proteína ciclina D1 promove a progressão do ciclo celular através da transição da fase G1/S (LAI; MITCHELL, 2005) e a sua expressão pode ser resultado da ativação do gene CCND1 (MERCHANT; SAQUI-SALCES, 2014). Sua ação baseia-se na

ativação das quinases dependentes de ciclina (CDK4 e CDK6), regulando a passagem da célula pelo ponto de restrição G₁/S (SHERR, 1996; DYSON, 1998; FU et al., 2004). Como a ciclina D1 é um regulador crítico do ciclo celular (SHERR, 1996; DYSON, 1998), sua disfunção pode estar associada com alterações no controle regulatório do ciclo celular, levando à progressão de tumores.

Os resultados do presente estudo não apresentaram diferenças significantes de expressão da ciclina D1 entre os GCCG e FOJ. As CG apresentaram maior expressão para este marcador quando comparadas com as CM, o que está de acordo com o que foi observado por Kauzman et al. (2004). Além disso, não houve diferença significativa da expressão da ciclina D1 entre GCCGNA e GCCGAG, sugerindo que a disfunção desta proteína não participa de forma mais acentuada na progressão das lesões agressivas. Houve ainda correlação positiva significativa entre esta proteína e o D2-40 em GCCGAG, porém a correlação entre a expressão destes dois marcadores ainda é desconhecida.

Segundo Kauzman et al. (2004) a superexpressão da ciclina D1 pelas CG pode estar envolvida na formação destas células e na patogênese dos GCCG, já que em seu estudo as mesmas apresentaram imunonegatividade para marcadores de proliferação celular (Ki-67 e ciclina B1), ou seja, indicando que as CG não estariam proliferando. No mesmo estudo, eles analisaram que devido ao fato dos GCCG e TCG apresentarem um padrão de expressão imuno-histoquímico idêntico para os marcadores do ciclo celular, estas lesões representariam um mesmo processo patológico com diferentes características clínicas e radiográficas, influenciadas pela distinta anatomia dos locais acometidos. Ainda segundo estes autores, que compararam GCCG com alguns casos de inflamação granulomatosa que continham CG, a formação das CG nas lesões inflamatórias difere da formação das CG em GCCG, visto que as CG não apresentaram imunopositividade para a ciclina D1 nos casos de inflamação granulomatosa, ao contrário do que foi observado nas CG dos GCCG.

De acordo com Lujic et al. (2016), os TCG que apresentam imunopositividade nas CG para a ciclina D1 possuiriam um risco aumentado de recorrência. Porém, ao contrário do que se espera, elevados níveis de ciclina D1 podem inibir a proliferação celular através da ligação com o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (MAGA; HUBSCHER, 2003). Além disso, a expressão aberrante de ciclina D1 em fibroblastos normais previne a entrada da célula na fase S do ciclo celular (ATADJA et al., 1995).

Estas constatações auxiliam na explicação e aceitação do fato de que as CG, imunopositivas para a ciclina D1, não sejam o componente proliferativo dos GCCG e que este marcador poderia, de fato, representar um papel importante e ainda desconhecido na patogênese destas lesões.

A proteína Ki-67 é o marcador de proliferação celular mais conhecido, sendo expresso em células que se encontram em proliferação, mas que desaparece rapidamente quando a célula adentra em estado de repouso (ENDL et al., 2001). A expressão deste marcador, porém, oferece informações pouco precisas, uma vez que evidencia a fração total de células em proliferação, ou seja, todas as células que se encontrem em alguma fase do ciclo celular (LAMEIRA et al., 2014). Diante deste contexto, o presente estudo constatou que a expressão para o Ki-67 foi negativa em todos os casos de GCCGNA, GCCGAG e FOJ, o que representa um baixo potencial de proliferação celular. Porém, este resultado contrasta com o que é observado em estudos prévios (O'MALLEY et al., 1997; DE SOUZA et al., 1999; DE SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000; KAUZMAN et al., 2004; KUJAN et al., 2015), o que pode ser explicado pelo fato do presente estudo ter utilizado um clone (SP6) diferente dos utilizados em outros trabalhos (O'MALLEY et al., 1997; DE SOUZA et al., 1999; DE SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000; KAUZMAN et al., 2004; KUJAN et al., 2015). Além disso, apesar de poucas CM terem apresentado imunopositividade para o Ki-67 em GCCG, a expressão para este marcador foi considerada negativa, pois as células marcadas representavam uma porcentagem baixa das áreas lesionais avaliadas. Desta forma, não houve correlações com os demais marcadores avaliados, nem diferenças significantes entre as lesões estudadas.

Com relação a diferença de imunopositividade para o Ki-67 entre GCCGNA e GCCGAG O'malley et al. (1997) e Kruse-lösler et al. (2006) relataram não haver diferenças de imunoexpressão entre estas duas variantes. De Souza et al. (1999) compararam a atividade proliferativa dos GCCG com TCG e observaram um menor percentual de células Ki-67 positivas nos TCG, contrastando com comportamento biológico entre estas duas lesões. Outra constatação similar foi realizada por De Souza; Mesquita; Gomez (2000) e Kujan et al. (2015), que relataram uma maior porcentagem de células Ki-67 positivas em Granulomas de Células Gigantes Periféricos (GCCP) em comparação com GCCG. Estes achados poderiam ser explicados se os GCCG fossem considerados lesões reparativas associados à processos inflamatórios constantes.

De acordo com estudos prévios (O'MALLEY et al., 1997; DE SOUZA et al., 1999; DE SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000; TIAN; LI; YU, 2003; KAUZMAN et al., 2004; KUJAN et al., 2015) apenas as CM apresentam imunopositividade para o Ki-67. Segundo Kauzman et al. (2004) e Kujan et al. (2015) estes resultados indicam que as CG não estão envolvidas na atividade proliferativa das lesões, o que ficaria a cargo das CM, responsáveis pela agressividade das mesmas, apesar da aparente falta de correlação da imunoposição frente ao Ki-67 com o comportamento biológico dos GCCG, como já descrito anteriormente (DE SOUZA et al., 1999; DE SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000).

O SMA é um marcador de células musculares lisas, capaz de detectar a presença miofibroblastos (GIULIA et al., 2016). Os miofibroblastos, por sua vez, são células que possuem características concomitantes de células musculares lisas e fibroblastos (TOMASEK et al., 2002), estando presentes em tecidos em processos reparativos, assim como em tecidos neoplásicos (TOMASEK et al., 2002; DE WEVER; MAREEL, 2003). Praticamente todos os casos de GCCG apresentaram alta expressão para esta proteína, estando de acordo com o que é observado em estudos prévios (O'MALLEY et al., 1997; VERED et al., 2007; KUJAN et al., 2015; MAIZ; DE LA ROSA-GARCÍA; CAMACHO, 2016). Além disso, todos os casos de FOJ do presente estudo apresentaram imunopositividade para o SMA, sendo que a expressão deste marcador não apresentou diferenças significantes entre os casos de GCCG e FOJ. O seu papel na patogênese dos GCCG ainda é incerto, pois a sua presença parece ocorrer de maneira similar tanto nas lesões agressivas quanto nas lesões não agressivas (VERED et al., 2007), fato que também foi observado no presente estudo, pois não houve diferença de expressão significativa do SMA entre os GCCGNA e GCCGAG. Além disso, foi observada uma correlação positiva entre D2-40 e SMA em GCCGAG, porém a correlação entre a expressão destes dois marcadores ainda é desconhecida.

Segundo Vered et al. (2007), o comportamento biológico dos GCCG pode estar associado com a origem dos miofibroblastos, que podem derivar tanto das células mesenquimais indiferenciadas quanto de macrófagos completamente diferenciados. O processo de transformação de macrófagos em miofibroblastos é chamado transdiferenciação (MENG et al., 2016) e ocorre através da via de sinalização TGF- β /Smad3 (WANG et al., 2016). As células que sofrem este processo são chamadas de células de transição macrófago-fibroblastos (MENG et al., 2016; WANG et al., 2016),

com predominância de macrófagos do tipo M2 (MENG et al., 2016; WANG et al., 2016). Estudos futuros poderiam avaliar a presença e o papel destes tipos de células na patogênese dos GCCG, através da utilização de duplas marcações para os marcadores CD68 e SMA. Curiosamente, foi observada uma correlação negativa entre SMA e CD68, mas que não apresentou significância estatística, concordando com os resultados de Kujan et al. (2015) que também não encontraram correlação significativa entre estes dois marcadores.

O marcador DOG1 é uma proteína de função desconhecida que se mostra expressa seletivamente em tumores estromais gastrointestinais (WEST et al., 2004). Sua expressão em outros tumores mesenquimais ou não mesenquimais é raramente observada (LEE; LIANG; ESPINOSA, 2010). Estruturalmente, esta proteína apresenta oito domínios transmembrana, consistentes com a sua localização membranar (LEE; LIANG; ESPINOSA, 2010), sendo considerada um canal de cloreto ativado por cálcio (CAPUTO et al., 2008; YANG et al., 2008). A razão pela qual o DOG1 foi incluído neste estudo, baseia-se nos trabalhos de Akpalo et al. (2012) e Cleven et al. (2016). O primeiro realizou um estudo imuno-histoquímico que incluiu a utilização deste marcador na avaliação de fibromas condromixóides, TCG e condroblastomas, que possuem CG osteoclásticas dispersas em sua composição. Como resultados, todos os casos de condroblastomas apresentaram imunopositividade para o DOG1, enquanto os fibromas condromixóides e os TCG apresentaram imunonegatividade para o mesmo marcador, contribuindo, desta forma, para o diagnóstico diferencial entre condroblastomas e TCG.

Baseado nos resultados descritos acima, Cleven et al. (2016) avaliaram a expressão do DOG1 em tumores ósseos contendo células gigantes e observaram uma expressão positiva deste marcador nos casos de condroblastomas em detrimento aos demais tumores ósseos contendo CG, que apresentaram imunonegatividade em todos os casos. Nossos resultados não revelaram expressão para o marcador DOG1 tanto em GCCG quanto em FOJ, sendo que este é o primeiro estudo a avaliar o DOG1 em GCCG e FOJ. Diante dos resultados observados, este marcador parece não desempenhar papel significativo na patogênese dos GCCG, mas poderia ser utilizado no diagnóstico diferencial de condroblastomas com outras lesões similares.

A via de sinalização HH é uma das vias que participam do desenvolvimento embrionário e que se encontram em estado inativo em tecidos adultos normais. Em situações de manutenção de células-tronco e reparo tecidual, pode ocorrer a ativação

destas vias (COHEN, 2012; MCMILLAN; MATSUI, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013). Quando desregulada, a via HH pode ser ativada por um de seus três ligantes (SHH, IHH e DHH) (HUANGFU; ANDERSON, 2006), através de mecanismos autócrinos e parácrinos (SCALES; DE SAUVAGE, 2009; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013). A ativação autócrina consiste na secreção do ligante por células neoplásicas, que irá atuar no receptor presente na própria célula, constituindo um mecanismo de auto ativação da via. Na ativação parácrina da via, a secreção do ligante também é realizada pelo parênquima, porém sua atuação ocorrerá em células estromais, que poderão secretar fatores de crescimento tumorais e fatores pró-angiogênicos, auxiliando a progressão do tumor. Quando ocorre ativação de células neoplásicas através de ligantes produzidos pelo estroma tumoral, constitui-se um quadro de ativação parácrina reversa (SCALES; DE SAUVAGE, 2009; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013).

Após a secreção do ligante da via HH, este irá de ligar ao receptor PTCH, provocando seu deslocamento na membrana celular e permitindo a ativação da SMO, que irá desencadear a cascata de sinalização responsável pela ativação e liberação dos fatores de transcrição GLI. Por fim, estas proteínas ativadas irão translocar-se para o núcleo celular, resultando na ativação de vários genes específicos (TAYLOR et al., 2002; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013), como Myc, Bcl-2 e ciclina D1, responsáveis pela diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (VARJOSALO; TAIPALE, 2008; SCALES; DE SAUVAGE, 2009).

Os resultados deste trabalho demonstram a participação dos componentes (SHH e GLI1) da via de sinalização HH em GCCG e FOJ, não havendo diferença de expressão significativa do SHH entre os GCCGNA e GCGNA, sugerindo que esta via não contribui para a diferenciação destas duas variantes. Também não houve diferenças significantes de expressão do SHH entre GCCG e FOJ, sugerindo que estas lesões possam apresentar patogênese semelhante. Em GCCG, as CM e CG apresentaram expressão para este marcador, revelando haver desregulação desta via, o que pode tornar seus componentes alvos de novos agentes terapêuticos (PEUKERT; MILLER-MOSLIN, 2010; SEKULIC et al., 2012), utilizados no tratamento de neoplasias com a via de sinalização HH ativada. Além disso, houve correlação negativa significativa entre SMA e SHH em GCGNA, ao contrário do que foi observado nos GCCGAG, quando esta correlação foi positiva, porém sem significância estatística. Entretanto, alguns autores

afirmam que o SHH associado ao PDGF estimula a proliferação de células musculares lisas de vasos sanguíneos (LI et al., 2010; ZENG et al., 2016).

Com relação ao marcador GLI1, a expressão nuclear positiva observada na maioria dos casos de GCCG confirma a participação da via HH no desenvolvimento destas lesões, já que a translocação nuclear desta proteína ocorre somente após a ativação da cascata de sinalização (TAYLOR et al., 2002; HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012; ROBBINS; FEI; RIOBO, 2012). Diferentemente do SHH, a imunoeexpressão do GLI1 ocorreu predominantemente no núcleo das CM e CG, apesar de haver expressão citoplasmática do mesmo, evidenciando a sua presença na forma inativa, ou seja, na ausência do ligante (antes do processo de translocação) (SHENG et al., 2006). Como era de se esperar, houve correlação positiva da expressão do GLI1 com a expressão do SHH, mas apenas em GCCGNA. Outra correlação positiva significativa ocorreu com a ciclina D1 em GCCGAG, uma proteína codificada pelo gene de mesmo, que é um dos alvos da via HH, da qual participa o GLI1 (CHARI; MCDONNELL, 2007; SCALES; DE SAUVAGE, 2009), podendo representar um mecanismo de retroalimentação positivo.

A correlação entre CD34 x GLI1 foi negativa, ou seja, a expressão do GLI1 parece não estar relacionada com o estímulo à angiogênese em GCCG, apesar de ter havido significância estatística apenas nas lesões não agressivas. Entretanto, alguns estudos (HONAMI et al., 2012; VALVERDE et al., 2016) têm demonstrado uma correlação entre a expressão dos componentes da via HH e um maior nível de angiogênese. Os resultados do presente estudo evidenciaram pouca marcação em células endoteliais de vasos sanguíneos, representando uma menor contribuição dos componentes desta via para angiogênese dos GCCG.

Diante deste quadro, o presente estudo não apresentou diferenças significantes de expressão dos marcadores entre os GCCGNA e GCCGAG. Apesar de poucos estudos compararem a expressão imuno-histoquímica entre GCCGNA e GCCGAG (O'MALLEY et al., 1997; KRUSE-LÖSLER et al., 2006; VERED et al., 2007; DEWSNUP et al., 2008; SUSARLA et al., 2009; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012; KAHN et al., 2017), estas duas variantes apresentam um perfil imuno-histoquímico semelhante, o que dificulta a diferenciação entre elas, já que as mesmas também apresentam características histológicas semelhantes (SMALL; ROWE, 1975; CHUONG; KABAN, 1985; AUCLAIR et al., 1988; DE SOUZA et al., 1999; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012).

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir:

1. A expressão proteica dos marcadores utilizados neste estudo não permitiu diferenciar os GCCGNA dos GCCGAG, uma vez que o perfil imuno-histoquímico de ambos é semelhante;
2. GCCG e FOJ também apresentaram perfil imuno-histoquímico semelhante, embora os FOJ tenham apresentado maior densidade vascular e menor participação dos componentes da via HH, especialmente do GLI1, quando comparados aos GCCG;
3. Os GCCGAG estiveram significativamente mais associados com dentes, lesões de maior diâmetro e sintomatologia associada à lesão;
4. A sintomatologia associada à lesão representou um fator de risco (doze vezes maior) significativa para os GCCGAG. Ao contrário das demais variáveis investigadas no presente estudo, que não apresentaram significância estatística no modelo de regressão logística univariada;
5. A via de sinalização HH mostrou-se ativa em GCCG e, embora seus principais componentes (SHH e GLI1) tenham se mostrado positivamente correlacionados tanto em GCCGNA quanto em GCCGAG, os mesmos não estiveram correlacionados com a proliferação miofibroblástica, nem com a angiogênese em GCCG. Ainda com relação a via HH, parece existir um mecanismo de retroalimentação positivo entre GLI1 e ciclina D1 em GCCGAG.
6. A maior presença de vasos neoformados foi correlacionada à menor expressão de macrófagos M1, o que pode contribuir para a agressividade destas lesões. Além disso, uma maior presença de células fagocitárias esteve correlacionada com uma maior presença de macrófagos M2 em GCCGAG;
7. Um padrão vascular mais elevado (CD34) é acompanhado de uma maior quantidade de vasos linfáticos (D2-40) em GCCGAG. Além disso, correlações entre uma maior presença de vasos linfáticos com uma maior expressão de miofibroblastos (SMA) e ciclina D1 também foram observadas;
8. O papel destas últimas correlações e dos vasos linfáticos em GCCG ainda precisa ser melhor estudado, embora pareça haver uma associação com a variante agressiva.

8 REFERÊNCIAS

AGHBALI, A. et al. IL-4 induces the formation of multinucleated giant cells and expression of $\beta 5$ integrin in central giant cell lesion. **Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal**, v. 22, n. 1, p. 1-6, jan. 2017.

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

AKPALO, H.; LANGE, C.; ZUSTIN, J. Discovered on gastrointestinal stromal tumor 1 (DOG1): a useful immunohistochemical marker for diagnosing chondroblastoma. **Histopathology**, v. 60, n. 7, p. 1099-1106, jun. 2012.

ALLAVENA, P. et al. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 66, n. 1, p. 1–9, abr. 2008.

AMAKYE, D.; JAGANI, Z.; DORSCH, M. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. **Nature medicine**, v. 19, n. 11, p. 1410–1422, nov. 2013.

ATADJA, P. et al. Overexpression of cyclin D1 blocks proliferation of normal diploid fibroblasts. **Experimental Cell Research**, v. 217, n. 2, p. 205-216, abr. 1995.

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

AUSTIN, L. T. Jr., DAHLIN, D. C.; ROYER, R. Q. Giant-cell reparative granuloma and related conditions affecting the jawbones. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 12, p. 1285-1295, nov. 1959.

BARBIERI, C; E.; PIETENPOL, J. A. p63 and epithelial biology. **Experimental Cell Research**, v. 312, n. 6, p. 695-706, abr. 2006.

BARNES, L. et al. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, 3th Edition, p. 319-320, 2005.

BARROS, M. H. M. et al. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. **PLOS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

BERMAN, D. M. et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. **Nature**, v. 425, n. 6960, p. 846-851, out. 2003.

BINGLE, L.; BROWN, N. J.; LEWIS, C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. **Journal of Pathology**, v. 196, n. 3, p. 254–265, mar. 2002.

BONETTI, F. et al. Peripheral giant cell granuloma: evidence for osteoclastic differentiation. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 70, n. 4, p. 471-475, out. 1990.

BREDELL, M. et al. Denosumab as a Treatment Alternative for Central Giant Cell Granuloma: A Long-Term Retrospective Cohort Study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, ahead of print, set. 2017.

BUIM, M. E. C. et al. Activation of sonic hedgehog signaling in oral squamous cell carcinomas: a preliminary study. **Human Pathology**, v. 42, n. 10, p. 1484–1490, out. 2011.

CABIBI, D. et al. D2-40 negative pyogenic granuloma-like Kaposi's sarcoma: Diagnostic features and histogenetic hypothesis of an uncommon skin tumor in HIV-negative patients. **Pathology, Research and Practice**, v. 211, n. 7, p. 528-532, jul. 2015.

CAPUTO, A. et al. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. **Science**, v. 322, n. 5901, p. 590-594, out. 2008.

CARVALHO, Y. R. et al. Peripheral giant cell granuloma. An immunohistochemical and ultrastructural study. **Oral Diseases**, v. 1, n. 1, p. 20-25, mar. 1995.

CELLI, J. et al. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. **Cell**, v. 99, n. 2, p. 143-153, out. 1999.

CHARI, N. S.; MCDONNELL, T. J. The sonic hedgehog signaling network in development and neoplasia. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 14, n. 5, p. 344–352, set. 2007.

CHEIFETZ, S. et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 27, p. 19027-19030, set. 1992.

CHUONG, R.; KABAN, L. B. Diagnosis and treatment of jaw tumors in children. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 5, p. 323-332, mai. 1985.

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

CLEVEN, A. H. G. et al. DOG1 expression in giant-cell-containing bone tumours. **Histopathology**, v. 68, n. 6, p. 942-945, mai. 2016

COHEN, D. J. Targeting the hedgehog pathway: role in cancer and clinical implications of its inhibition. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 565–588, jun. 2012.

CONI, S.; INFANTE, P.; GULINO, A. Control of stem cells and cancer stem cells by Hedgehog signaling: pharmacologic clues from pathway dissection. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 5, p. 623–628, mar. 2013.

DARBY, I. A.; HEWITSON, T. D. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. **International Review of Cytology**, v. 257, p. 143-179, 2007.

DAYAN, D. et al. Molecular crosstalk between cancer cells and tumor microenvironment components suggests potential targets for new therapeutic approaches in mobile tongue cancer. **Cancer Medicine**, v. 1, n. 2, p. 128-140, out. 2012.

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. 792-795, ago. 2004.

DE LANGE, J.; VAN DEN AKKER, H. P. Clinical and radiologic features of central giant cell lesions of the jaw. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 99, n. 4, p. 464-470, abr. 2005.

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

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

DE MATOS, F. R. et al. Immunoexpression of TNF- α and TGF- β in central and peripheral giant cell lesions of the jaws. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 41, n. 2, p. 194-199, fev. 2012.

DE SOUZA, P. E. et al. Immunohistochemical expression of p53, MDM2, Ki-67 and PCNA in central giant cell granuloma and giant cell tumor. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 28, n, 2, p. 54-58, fev. 1999.

DE SOUZA, P. E. A.; MESQUITA, R. A.; GOMEZ, R. S. Evaluation of p53, PCNA, Ki-67, MDM2 and AgNOR in oral peripheral and central giant cell lesions. **Oral Diseases**, v. 6, n. 1, p. 35-39, jan. 2000.

DE WEVER, O.; MAREEL M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. **The Journal of Pathology**, v. 200, n. 4, p. 429-447, jul. 2003.

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, mai. 2008.

DICKSON, B. C. et al. Giant cell tumor of bone express p63. **Modern Pathology**, v. 21, n. 4, p. 369-375, abr. 2008.

DIEHL, J. A. Cycling to cancer with cyclin D1. **Cancer Biology & Therapy**, v. 1, n. 3, p. 226-231, mai. 2002.

DING, L. et al. α -Smooth muscle actin-positive myofibroblasts, in association with epithelial-mesenchymal transition and lymphogenesis, is a critical prognostic parameter in patients with oral tongue squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 43, n. 5, p. 335-343, mai. 2014.

DOEDEN, K. et al. Lymphatic invasion in cutaneous melanoma is associated with sentinel lymph node metastasis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 36, n. 7, p. 772-780, jul. 2009.

DONNELLAN, R.; CHETTY, R. Cyclin D1 and human neoplasia. **Molecular Pathology**, v. 51, n. 1, p. 1-7, fev. 1998.

DULTRA, F. K. A. A. et al. Immunohistochemical assessment of CD1a-positive Langerhans cells and their relationship with E-cadherin in minor salivary gland tumors. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 41, n. 1, p. 47-53, jan. 2012.

DYSON, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. **Genes & Development**, v. 12, n. 15, p. 2245-2262, ago. 1998.

ELLIS, P. A. et al. Absence of p21 expression is associated with abnormal p53 in human breast carcinomas. **British Journal of Cancer**, v. 76, n. 4, p. 480-485, 1997.

EL-MOFTY, S. Psammomatoid and trabecular juvenile ossifying fibroma of the craniofacial skeleton: Two distinct clinicopathologic entities. **Oral Surgery, Oral**

Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, v. 93, n. 3, p. 296-304, mar. 2002.

EL-NAGGAR, A. K. et al. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, 4th Edition, p. 251-257, 2017.

ENDL, E. et al. The expression of Ki-67, MCM3, and p27 defines distinct subsets of proliferating, resting, and differentiated cells. **The Journal of Pathology**, v. 195, n. 4, p. 457-62, nov. 2001.

ESPINOSA, I. et al. A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 32, n. 2, p. 210-218, fev. 2008.

ESSNER, R. Sentinel lymph node biopsy and melanoma biology. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 7, p. 2320-2325, abr. 2006.

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

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 581-611, ago. 2004.

FLANAGAN, A. M.; SPEIGHT, P. M. Giant cell lesions of the craniofacial bones. **Head and Neck Pathology**, v. 8, n. 4, p. 445-453, nov. 2014.

FLÓREZ-MORENO, G. A. et al. Cytomorphometric and immunohistochemical comparison between central and peripheral giant cell lesions of the jaws. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 105, n. 5, p. 625-632, mai. 2008.

FREGNANI, E. R. Presence of myofibroblasts and expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in ameloblastomas correlate with rupture of the osseous cortical. **Pathology & Oncology Research**, v. 15, n. 2, p. 231-240, jun. 2009.

FU, M. et al. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. **Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 5439-5447, dez. 2004.

FUJII, N. et al. Cancer-associated fibroblasts and CD163-positive macrophages in oral squamous cell carcinoma: their clinicopathological and prognostic significance. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 41, n. 6, p. 444–451, jul. 2012.

GERDES, J. et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **The American Journal of Pathology**, v. 138, n. 4, p. 867-873, abr. 1991.

GIULIA, P. et al. Brain Atrophy, Anti-Smooth Muscle Antibody and Cognitive Impairment: An Association Study. **Aging and Disease**, v. 7, n. 4, p. 318-325, nov. 2015.

GUPTA, B. et al. A novel approach to the management of a central giant cell granuloma with denosumab: A case report and review of current treatments. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 43, n. 7, p. 1127-1132, set. 2015.

HAMMAS, N. et al. Can p63 serve as a biomarker for giant cell tumor of bone? A Moroccan experience. **Diagnostic Pathology**, set. 2012.

HARDCASTLE, Z. et al. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. **Development**, v. 125, n. 15, p. 2803–2811, ago. 1998.

HASSOUNAH, N. B.; BUNCH, T. A.; MCDERMOTT, K. M. Molecular pathways: the role of primary cilia in cancer progression and therapeutics with a focus on Hedgehog signaling. *Clinical Cancer Research*, v. 18, n. 9, p. 2429-2435, mai. 2012.

HE, K.-F. et al. CD163+ tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-9, jan. 2014.

HIRAMA, T.; KOEFFLER, H. P. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. **Blood Journal**, v. 86, n. 3, p. 841-854, ago. 1995.

HOLNESS, C. L.; SIMMONS, D. L. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. **Blood Journal**, v. 81, n. 6, p. 1607-1613, mar. 1993.

HONAMI, T. et al. Sonic hedgehog signaling promotes growth of oral squamous cell carcinoma cells associated with bone destruction. **Oral Oncology**, v. 48, n. 1, p. 49–55, jan. 2012.

HUANGFU, D.; ANDERSON, K. V. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. **Development**, v. 133, n. 1, p. 3–14, jan. 2006.

INGHAM, P. W.; MCMAHON, A. P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. **Genes & Development**, v. 15, n. 23, p. 3059–3087, dez. 2001.

ITONAGA, I. et al. Cellular mechanisms of osteoclast formation and lacunar resorption in giant cell granuloma of the jaw. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 32, n. 4, p. 224-231, abr. 2003.

JALAVA, P. et al. Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index. **Histopathology**, v. 48, n. 6, p. 674-682, mai. 2006.

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, p. 1145-1149, jun. 1999.

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

KAFFE, I. et al. Radiologic features of central giant cell granuloma of the jaws. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 81, n. 6, p. 720-726, jun. 1996.

KAHN, H. J.; MARKS, A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. **Laboratory Investigation**, v. 82, n. 9, p. 1255-1257, set. 2002.

KAHN, A. et al. Age and expression of CD163 and Colony-Stimulating Factor 1 Receptor (CD115) are associated with the biological behavior of Central Giant Cell Granuloma. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 75, n. 7, p. 1414-1424, jul. 2017.

KALLURI, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 422-433, jun. 2003.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392-401, mai. 2006.

KAMPER, P. et al. Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. **Haematologica**, v. 96, n. 2, p. 269-276, mar. 2011.

KARHADKAR, S. S. et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. **Nature**, v. 431, n. 7009, p. 707-712, out. 2004.

KATANO, M. Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer. **Cancer Letters**, v. 227, n. 2, p. 99-104, set. 2005.

KAUZMAN, A. et al. Cyclin alterations in giant cell tumor of bone. **Modern Pathology**, v. 16, n. 3, p. 210-218, mar. 2003.

KAUZMAN, A. et al. Central giant cell granuloma of the jaws: assessment of cell cycle proteins. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 33, n. 3, p. 170-176, mar. 2004.

KELLERMANN, M. G. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. **Histopathology**, v. 51, n. 6, p. 849-853, dez. 2007.

KONG, L. et al. The Clinical Significance of the CD163+ and CD68+ Macrophages in Patients with Hepatocellular Carcinoma. **PLoS One**, v. 8, n. 3, mar. 2013.

KRISTIANSEN, M. et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 198-201, jan. 2001.

KRUSE-LÖSLER, B. et al. Central giant cell granuloma of the jaws: a clinical, radiologic, and histopathologic study of 26 cases. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 101, n. 3, p. 346-354, mar. 2006.

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

KUMAR, V. V. et al. Quantification and Correlation of Angiogenesis with Macrophages by Histomorphometric Method in Central and Peripheral Giant Cell Granuloma: An Immunohistochemical Analysis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 3, p. 1-5, mar. 2016.

LAI, L. P.; MITCHELL, J. Indian hedgehog: its roles and regulation in endochondral bone development. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 96, n. 6, p. 1163–1173, dez. 2005.

LAMEIRA, A. G. et al. MCM3 could be a better marker than Ki-67 for evaluation of dysplastic oral lesions: an immunohistochemical study. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 43, n. 6, p. 427–34, jul. 2014.

LEE, C. H. et al. Gene expression profiling identifies p63 as a diagnostic marker for giant cell tumor of the bone. **Modern Pathology**, v.21, n. 5, p. 531-539, mai. 2008.

LEE, C. H.; LIANG, C. W.; ESPINOSA, I. The utility of discovered on gastrointestinal stromal tumor 1 (DOG1) antibody in surgical pathology-the GIST of it. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 17, n. 3, p. 222-232, mai. 2010.

LEVORATO, C. D. et al. Fatores associados à procura por serviços de saúde numa perspectiva relacional de gênero. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 4, p. 1263-1274, abr. 2014.

LI, F. et al. Sonic hedgehog signaling induces vascular smooth muscle cell proliferation via induction of the G1 cyclin-retinoblastoma axis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 9, p. 1787-1794, set. 2010.

LIEGL, B. et al. Monoclonal antibody DOG1.1 shows higher sensitivity than KIT in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors, including unusual subtypes. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 33, n. 3, p. 437-446, mar. 2009.

LITTLE, N. A.; JOCHEMSEN, A. G. p63. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, n. 1, p. 6-9, jan. 2002.

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. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 32, n. 6, p. 367-375, jul. 2003.

LUJIC, N. et al. Recurrence of giant cell tumour of bone: role of p53, cyclin D1, β -catenin and Ki67. **International Orthopaedics**, v. 40, n. 11, p. 2393-2399, nov. 2016.

MAGA, G.; HUBSCHER, U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 15, p. 3051-3060, ago. 2003.

MAIZ, N. N.; DE LA ROSA-GARCÍA, E., CAMACHO, M. E. Immunohistochemical expression of alpha-smooth muscle actin and glucocorticoid and calcitonin receptors in central giant-cell lesions. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 45, n. 4, p. 289-294, abr. 2016.

MCCORMICK, D. et al. Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. **Histopathology**, v. 22, n. 4, p. 355-360, abr. 1993.

MCMILLAN, R.; MATSUI, W. Molecular pathways: the hedgehog signaling pathway in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 18, p. 4883–4888, set. 2012.

MENG, X. M. et al. Inflammatory macrophages can transdifferentiate into myofibroblasts during renal fibrosis. **Cell Death & Disease**, v. 7, n. 12, p. 1-9, dez. 2016.

MERCHANT, J. L.; SAQUI-SALCES, M. Inhibition of Hedgehog signaling in the gastrointestinal tract: targeting the cancer microenvironment. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 1, p. 12–21, fev. 2014.

MILLS, A. A. p63: oncogene or tumor suppressor? **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 16, n. 1, p. 38-44, fev. 2006.

MOHAMMED, R. A. A. et al. Objective assessment of lymphatic and blood vascular invasion in lymph node-negative breast carcinoma: findings from a large case series with long-term follow-up. **The Journal of Pathology**, v. 223, n. 3, p. 358-365, fev. 2011.

MUKHERJEE, S. et al. Hedgehog signaling and response to cyclopamine differ in epithelial and stromal cells in benign breast and breast cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 5, n. 6, p. 674-683, jun. 2006.

NAGASAWA, T. et al. LPS-stimulated human gingival fibroblasts inhibit the differentiation of monocytes into osteoclasts through the production of osteoprotegerin. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 130, n. 2, p. 338-344, nov. 2002.

NAIDU, A. et al. Management of central giant cell granuloma with subcutaneous denosumab therapy. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 12, p. 2469-2484, dez. 2014.

NAKAYAMA, H.; ENZAN, H.; YASUI, W. Expression of podoplanin/D2-40 in pericryptal stromal cells in superficial colorectal epithelial neoplasia. **Medical Molecular Morphology**, v. 46, n. 1, p. 20-23, mar. 2013.

O'MALLEY, M. et al. Central giant cell granulomas of the jaws: phenotype and proliferation-associated markers. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 26, n. 4, p. 159-163, abr. 1997.

O'CONNELL, J. E. et al. Aggressive giant cell lesion of the jaws: a review of management options and report of a mandibular lesion treated with denosumab. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 120, n. 5, p. 191-198, nov. 2015.

OKAMOTO, E. et al. Significance of podoplanin expression in keratocystic odontogenic tumor. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n. 1, p. 110-114, jan. 2010.

OSADA, M. et al. Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. **Nature Medicine**, v. 4, n. 7, p. 839-843, jul. 1998.

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? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 70, n. 8, p. 1860-1866, ago. 2012.

PEDERSEN, M. B. et al. High intratumoral macrophage content is an adverse prognostic feature in anaplastic large cell lymphoma. **Histopathology**, v. 65, n. 4, p. 490–500, out. 2014.

PEUKERT, S.; MILLER-MOSLIN, K. Small-molecule inhibitors of the hedgehog signaling pathway as cancer therapeutics. **ChemMedChem**, v. 5, n. 4, p. 500-512, abr. 2010.

POGREL, M. A. Calcitonin therapy for central giant cell granuloma. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 61, n. 6, p. 649-653, jun. 2003.

PUSZTASZERI, M. P.; SEELENTAG, W.; BOSMAN, F. T. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 54, n. 4, p. 385-395, abr. 2006.

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

RIBEIRO, M. C. S. A. et al. Perfil sociodemográfico e padrão de utilização de serviços de saúde para usuários e não-usuários do SUS – PNAD 2003. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 11, n. 4, p. 1011-1022, 2006.

RIES, C. H. et al. Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. **Cancer Cell**, v. 25, n. 6, p. 846-859, jun. 2014.

ROBBINS, D. J.; FEI, D. L.; RIOBO, N. A. The Hedgehog signal transduction network. **Science Signaling**, v. 5, n. 246, out. 2012.

SARGOLZAEI, S.; TAGHAVI, N.; POURSAFAR, F. Are CD68 and Factor VIII-RA Expression Different in Central and Peripheral Giant Cell Granuloma of Jaw: An Immunohistochemical Comparative Study. **Turk Patoloji Dergisi**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2017.

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, jul. 2014.

SCALES, S. J.; DE SAUVAGE, F. J. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 6, p. 303-312, jun. 2009.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, n. 3, p. 311-322, mar. 2000.

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, jul. 2014.

SEKULIC A. et al. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 23, p. 2171-2179, jun. 2012.

SHENG, T. et al. Regulation of Gli1 localization by the cAMP/protein kinase A signaling axis through a site near the nuclear localization signal. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 1, p. 9-12, jan. 2006.

SHERR, C. J. Cancer cell cycles. **Science**, v. 274, n. 5293, p. 1672-1677, dez. 1996.

SICA, A. et al. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 6, p. 717-727, abr. 2006.

SICA, A. et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Seminars in Cancer Biology**, v. 18, n. 5, p. 349–355, out. 2008.

SMALL, G. S.; ROWE, N. H. A "true giant cell tumor" in the mandible? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 33, n. 4, p. 296-301, abr. 1975.

SOUSA NETO, E. S. et al. Interaction of stromal and microvascular components in keratocystic odontogenic tumors. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 45, n. 8, p. 557-564, set. 2016.

SULAHIAN, T. H. et al. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. **Cytokine**, v. 12, n. 9, p. 1312-1321, set. 2000.

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

SUSARLA, S. M. et al. CD34 staining density predicts giant cell tumor clinical behavior. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 67, n. 5, p. 951-956, mai. 2009.

SYRIO, N. F. et al. IL-10 and IL-10 receptor overexpression in oral giant cell lesions. **Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal**, v. 16, n. 4, p. 488-492, jul. 2011.

TAJIMA, S.; FUKAYAMA, M. Possibility of D2-40 as a diagnostic and tumor differentiation-suggestive marker for some of phosphaturic mesenchymal tumors. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 8, p. 9390-9396, ago. 2015.

TAKEYA, M.; KOMOHARA, Y. Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: friend or foe? **Pathology International**, v. 66, n. 9, p. 491-505, dez. 2016.

TAYLOR, M. D. et al. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. **Nature Genetics**, v. 31, n. 3, p. 306-310, jul. 2002.

TIAN, X. F.; LI, T. J.; YU, S. F. Giant cell granuloma of the temporal bone: a case report with immunohistochemical, enzyme histochemical, and in vitro studies. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 127, n. 9, p. 1217-1220, set. 2003.

TIFFEE, J. C.; AUFDEMORTE, T. B. Markers for macrophage and osteoclast lineages in giant cell lesions of the oral cavity. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 55, n. 10, p. 1108-1112, out. 1997.

TOMASEK, J. J. et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 5, p. 349-363, mai. 2002.

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. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 40, n. 4, p. 334-337, abr. 2011.

VALVERDE, L. F. et al. Macrophages and endothelial cells orchestrate tumor-associated angiogenesis in oral cancer via hedgehog pathway activation. **Tumor Biology**, v. 37, n. 7, 9233-9241, jul. 2016.

VAN GORP, H.; DELPUTTE, P. L.; NAUWYNCK, H. J. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 7-8, p. 1650-1660, abr. 2010.

VARJOSALO, M.; TAIPALE, J. Hedgehog: functions and mechanisms. **Genes & Development**, v. 22, n. 18, p. 2454-2472, set. 2008.

VARSHA, V. K. et al. Expression of CD34 and CD68 in peripheral giant cell granuloma and central giant cell granuloma: An immunohistochemical analysis. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 18, n. 3, p. 341-348, dez. 2014.

VASCONCELOS, M. G. et al. Expression of CD34 and CD105 as markers for angiogenesis in oral vascular malformations and pyogenic granulomas. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 268, n. 8, p. 1213-1217, ago. 2011.

VERED, M. et al. Myofibroblasts in stroma of odontogenic cysts and tumors can contribute to variations in the biological behavior of lesions. **Oral Oncology**, v. 41, n. 10, p. 1028-1033, nov. 2005.

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

VERED, M. et al. Stromal myofibroblasts in central giant cell granuloma of the jaws cannot distinguish between non-aggressive and aggressive lesions. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 36, n. 8, p. 495-500, set. 2007.

VERED, M.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. Central giant cell granuloma of the jawbones - new insights into molecular biology with clinical implications on treatment approaches. **Histology and Histopathology**, v. 23, n. 9, p. 1151-1160, set. 2008.

VERHEIJEN, R. et al. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. **Journal of Cell Science**, v. 92, n. 1, p. 123-130, jan. 1989.

VIDAL, M. T. et al. The sonic hedgehog signaling pathway contributes to the development of salivary gland neoplasms regardless of perineural infiltration. **Tumor Biology**, v. 37, n. 7, p. 9587-9601, jul. 2016.

WANG, S. et al. Relationships of alpha-SMA-positive fibroblasts and SDF-1-positive tumor cells with neoangiogenesis in nasopharyngeal carcinoma. **BioMed Research International**, p. 1-9, 2014.

WANG, S. et al. TGF- β /Smad3 signalling regulates the transition of bone marrow-derived macrophages into myofibroblasts during tissue fibrosis. **Oncotarget**, v. 7, n. 8, p. 8809-8822, fev. 2016.

WEST, R. B. et al. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. **The American Journal of Pathology**, v. 165, n. 1, p. 107-113, jul. 2004.

WHITAKER, S. B.; WALDRON, C. A. Central giant cell lesions of the jaws. A clinical, radiologic, and histopathologic study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 75, n. 2, p. 199-208, fev. 1993.

YANG, A. et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. **Molecular Cell**, v. 2, n. 3, p. 305-316, set. 1998.

YANG, A. et al. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. **Trends in Genetics**, v. 18, n. 2, p. 90-95, fev. 2002.

YANG, Y. D. et al. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. **Nature**, v. 455, n. 7217, p. 1210-1215, out. 2008.

ZENG, Q. et al. Shh mediates PDGF-induced contractile-to-synthetic phenotypic modulation in vascular smooth muscle cells through regulation of KLF4. **Experimental Cell Research**, v. 345, n. 1, p. 82-92, jul. 2016.

ZHENG, M. H. et al. Gene expression of vascular endothelial growth factor in giant cell tumors of bone. **Human Pathology**, v. 31, n. 7, p. 804-812, jul. 2000.