UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

RENATA CORDEIRO TEIXEIRA

**Estudo microscópico morfométrico e genotípico de pacientes
portadores de lesão central de células gigantes**

BAURU
2011

RENATA CORDEIRO TEIXEIRA

**Estudo microscópico morfométrico e genotípico de pacientes
portadores de lesão central de células gigantes**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de doutor
em Odontologia.

Área de concentração: Estomatologia
Orientador: Prof. Dr. José Humberto
Damante

Versão corrigida

BAURU
2011

T235e Cordeiro Teixeira, Renata
Estudo microscópico morfométrico e genotípico
de pacientes portadores de lesão central de células
gigantes. / Renata Cordeiro Teixeira– Bauru, 2011.
86 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. José Humberto Damante

Nota: A versão original desta dissertação/tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 019/2008
Data: 27 de agosto de 2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Aparecida Cordeiro, por ser essa mulher de tanto valor, uma guerreira, que nunca me deixou desanimar. Se hoje posso apresentar esse trabalho é porque seu amor me ensinou a seguir em frente, mostrando-me os caminhos e valores. Obrigada por ter segurado a minha mão nas horas de maiores angústias e ter-me ensinado a transformar o medo na confiança necessária para que eu nunca desistisse dos meus sonhos.

Ao meu grande amor, Heraldo Medeiros, por sua paciência, amor, carinho e generosidade. Incansável na força que me dá na vida pessoal e profissional. Sinto-me completa ao seu lado. Dedico este trabalho ainda ao fruto desse amor, que se desenvolve em meu ventre, Artur, que desde a vida intra-uterina já me divide com a Odontologia e a vida acadêmica, um ser tão pequeno em tamanho que já me ensina tanto sobre amor incondicional, imensurável e infinito.

AGRADECIMENTOS

Moro em um trailer que partiu das margens da praia de Iracema no Ceará para além da megalópole de São Paulo. Avistei rios e arquiteturas de um outro povoado e logo parti. Na imensidão de São Paulo, no aconchego de Bauru, fiz verdadeiros e eternos amigos, conheci grandes mestres e comecei meus primeiros passos na Estomatologia/Radiologia. Precisei também percorrer esses mais de três mil quilômetros pra conhecer um cearense que sempre esteve tão perto, de olhar tão expressivo, de bondade e compreensão infinitas. Meu grande amor. E eu, que nunca fui de me aventurar, dei carona para as idéias de Mendel, pai da genética, e coloquei meu trailer num avião rumo à Alemanha. Lá, com o trailer sério demais, descobri que o amor havia ficado muito longe. Voltei então para buscá-lo no tempo e ali fizemos a maior festa: com cetim, anel e flores tropicais, na beira do mar de Iracema. Foi logo depois, bem ali, na beira mar de Iracema que iniciei também a tão sonhada carreira docente. Não demorou muito e estamos colorindo a parede de azul, comprando algodão e um bercinho, é o Artur que está a caminho. Ele nem sabe que mora num trailer também e nem ao menos se importa em saber aonde estamos estacionados. Envolto por estas paredes umbilicais não tem terra que seja, para o meu pequeno, estrangeira. Chegou a hora de colocar esse trailer novamente na estrada, para terminar o incabado. Finalmente o trabalho me parece feito e devo então agradecer às pessoas que me ajudaram a chegar até aqui, que não foram poucas, para então voltar à Iracema e continuar a regar meu jardim, que, preso à terra, imprimirá em verde as raízes de tanta estória. Por essa trajetória, agradeço...

Primeiramente à Deus, pelo dom da vida, por iluminar e guiar meu caminho.

Aos pacientes portadores de lesão central de células gigantes e seus familiares, que, a cada dia, surpreendem-me com sua sabedoria e garra na luta por melhores condições de vida. Por participarem desta pesquisa e acreditarem em um futuro melhor, mesmo sabendo das dificuldades enfrentadas na saúde pública do nosso país.

Aos meus orientadores da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, prof. Dr. José Humberto Damante e prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet. Por acreditarem em mim e confiarem no meu trabalho, estimulando-me e incentivando sempre. Tenho uma admiração enorme por vocês. Vocês são meus grandes espelhos profissionais, com quem aprendi e aprendo muito de valores humanos e científicos. Obrigada por tantas horas dedicadas a este trabalho com empenho e detalhismo.

Ao prof. Dr. Gustavo Garlet por ter sido o grande incentivador desta tese, da minha iniciação no universo da ciência básica e da biologia molecular.

Especialmente ao prof. Dr. José Humberto Damante, pela acolhida, por muitas vezes discordar, mas aceitar minha opinião, para que eu aprendesse com meus erros. Pela paciência e orientação diárias durante meus anos de aprendizado em Bauru. Por me ensinar tanto de ética e profissionalismo. E pelo exemplo de humanismo com que trata seu semelhante. Por ter me proporcionado a nobre oportunidade de ser sua orientada.

Ao meu orientador na RWTH-Alemanha, prof. Dr. Georg Conrads, pela receptividade e amizade, por me acolher de forma tão afetuosa dentro de seu laboratório e em sua família. Pela oportunidade de vivenciar uma experiência profissional e pessoal tão rica.

Aos demais professores do departamento de Estomatologia/Radiologia e Cirurgia, especialmente; Dra. Izabel Regina F. Rubira-Bullen, Dra. Ana Lúcia Álvares Capelloza, Dr. Luiz Eduardo M. Chinellato, Dr. Osny Ferreira Júnior e Dr. Eduardo Sant'Ana. Vocês foram fundamentais no meu processo de aprendizagem. Agradeço a atenção, carinho e conhecimentos transmitidos.

Ao prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos, por ser um grande mestre e incentivador. Tenho enorme admiração pelo profissional brilhante e pesquisador exemplar que o senhor é.

Ao prof. Dr. Renato Luiz Maia Nogueira, que me abriu as portas para tanto conhecimento e viabilizou a realização desta pesquisa com lesão central de células gigantes. Pela prontidão e simplicidade em atender e ensinar. Pela disponibilidade diária. Por conseguir sempre mostrar as coisas de uma maneira leve, simples, o que reflete exatamente o ser humano humilde e amoroso que você é. Muito obrigada mestre e orientador. Sou e serei eternamente grata pelos seus tão valiosos ensinamentos e minha admiração por você cresce a cada dia.

À profa. Dra. Roberta Barroso Cavalcante, pela incontestável contribuição nesta pesquisa. Pela descoberta e início de uma amizade que me mostra a cada dia a grande mulher e incrível profissional que você é. Tenho uma enorme e sincera admiração por você.

Ao Prof. Dr. Hans-Peter, à Isle Seyfarth, e a todos os professores e funcionários do laboratório de Imunologia e Microbiologia da RWTH-Aachen. Todos os dias vivenciados com vocês foram dias de intenso aprendizado científico e cultural. Muito obrigada por tudo!

A todos os amigos da pós-graduação em Estomatologia, especialmente à Marta Cunha, Ana Cláudia e Melissa Araujo, grandes amigas. Ter vocês ao meu lado nos momentos de alegria e frustrações fez com que a serenidade pudesse ser mantida e com que as dificuldades pudessem ser suportáveis durante esses anos de doutorado.

Aos funcionários do Departamento de Estomatologia/Radiologia/Cirurgia pela amizade e dedicação em ajudar sempre que precisei.

Aos funcionários e professores do Departamento de Histologia. À Danille Santi e Patrícia Germino, pelos ensinamentos, apoio e ajuda na concretização desta pesquisa. Ao prof. Dr. Gerson Francisco de Assis e prof. Dr. Rumi Taga, pela valiosa orientação na realização deste trabalho.

Em especial, à Dra. Tânia Mary Cestari, pela incansável ajuda. Pela disponibilidade e palavras certas. Muito obrigada pela paciência em ensinar. Seu profissionalismo e dedicação são exemplos a serem seguidos.

Ao Thiago Dionísio, pela ajuda e paciência na fase inicial deste estudo, pelos ensinamos transmitidos e pelo convívio prazeroso no laboratório de farmacologia.

À Capes e ao DAAD pela concessão das bolsas de estudo no Brasil e Alemanha.

À Faculdade de Odontologia de Bauru – USP e à RWTH-Aachen, e à todos aqueles que tornam o ambiente destas faculdades um lugar especial para se trabalhar.

Ao meu pai, Teixeira, por ser um homem de tanta força, fé e serenidade. Por sempre me estimular e acreditar no meu potencial. Amo você.

Ao meu irmão, Davi, por tantos momentos de dor e alegria compartilhados juntos. Por saber que, mesmo com tantas diferenças, teremos sempre um ao outro para dividir a vida. Amo você demais.

Ao Valdir Nóbrega, pelo exemplo de seriedade, responsabilidade e generosidade. Aprendi e aprendo muito com você.

A toda minha querida família, especialmente às amadas: tia Dodora e vovó Lourdes, por sempre estarem na minha torcida e vibrarem com as minhas conquistas.

Às minhas amigas-irmãs fortalezenses em Bauru: Aline, Livia (dinda), Clarice, Flora e Danielle. Vocês foram como flores plantadas ao longo dessa minha jornada, que me permitiram ter primavera o tempo todo. Obrigada por encher meu dia de cores e risos, por segurarem minha mão quando caminhar parecia difícil.

Aos amigos queridos que fiz na Alemanha e à minha “família alemã”, Kerstin, Frau Hannelore, Jürgen, Anne, Sabina e sua família, por terem tornado esse período distante tão agradável, pelos deliciosos momentos de alegria vivenciados juntos. Conviver com vocês me fez conhecer uma Alemanha linda, um país fascinante e apaixonante, onde ainda quero voltar muitas vezes.

E finalmente a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, tornaram possível a realização deste trabalho.

*"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende."*

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

A lesão central de células gigantes (LCCG) é uma afecção benigna dos maxilares, de comportamento biológico incerto, variando de discreta tumefação assintomática e de crescimento lento à uma forma agressiva, associada a dor, reabsorção radicular e óssea, com destruição cortical. Sua etiologia permanece desconhecida, havendo controvérsias entre processo reacional, neoplásico ou genético. Mutações no gene SH3BP2 foram identificadas em pacientes com querubismo, condição que compartilha várias características clínicas, radiográficas e histopatológicas com a LCCG. Para testar a hipótese de que tais mutações seriam responsáveis por, ou estariam associadas a LCCG e na tentativa de melhor entender a diferenciação microscópica/morfométrica das lesões agressivas e não agressivas, vinte e cinco pacientes portadores de LCCG foram selecionados para o estudo. O DNA foi obtido através do sangue e de espécimes em blocos de parafina, oriundos de biópsias e tratamento cirúrgico. Um estudo microscópico morfométrico foi paralelamente realizado, para avaliar o número de células gigantes e densidade de volume das mesmas nas lesões agressivas e não agressivas. O sequenciamento genético dos treze exons do gene SH3BP2 nos vinte e cinco pacientes estudados evidenciou uma alteração no códon do exon 4 em 10 pacientes. A densidade de volume de células gigantes foi maior nas lesões agressivas quando comparadas às não agressivas ($p=0,013$). Não houve diferença significativa quanto ao número de células gigantes/mm² em lesões agressivas e não agressivas ($p=0,245$).

Palavras-chave: Contagem de células. Células gigantes. Biologia molecular.

ABSTRACT

Microscopic morphometric and genotypic assessment of patients with central giant cell lesions

Central giant cell lesion (CGCL) is a benign disease of the jaws, with uncertain behavior, ranging from mild asymptomatic slow-growing swelling to an aggressive form, with pain, radicular and bone resorption and cortical destruction. Its aetiology is still unknown and there is discussion whether it is a reactive, neoplastic or genetic disease. Mutations on gene SH3BP3 were identified in patients with cherubism, which shares several clinical, radiographic and histopathological features with CGCL. In order to test the hypothesis that such mutations would be responsible for or would be related to CGCL and also in order to better understand microscopic morphometric differentiation of the aggressive and non-aggressive lesions, 25 patients with CGCL were selected to this study. DNA was extracted from blood samples and from tissue samples, obtained by biopsy or surgical treatment. Microscopic morphometric assessment was also performed, in order to evaluate the number and the volume density of the giant cells in aggressive and in non-aggressive lesions. Gene sequencing of all 13 exons in gene SH3BP3, performed on each of the 25 patients, showed an alteration in one codon from exon 4, in ten patients. Volume density of giant cells was greater in aggressive lesions than in non-aggressive ones ($p=0,013$). There was no significant difference on the number of giant cells per mm^2 when comparing aggressive and non-aggressive lesions.

Keywords: Cell counting. Giant cells. Molecular Biology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 - Esquema de casualização dos 50 campos microscópicos para cada corte histológico analisado.....	43
Figura 2 - Imagens consideradas como CGM (circundadas em azul) durante o estudo morfológico.....	44
Figura 3 - Imagem do sistema-teste sobreposto a uma área da lesão (um campo de contagem) exibindo $P_i = 22$ e $N_i = 4$	45
Figura 4 - Figura 4: Fotomicrografia de LCCG do grupo 1. A-B) Observar nas imagens em menor aumento as CGM (seta fina) exibindo formatos e tamanhos variados dispersas no tecido conjuntivo, contendo vasos calibrosos (seta vazada) e extravasamento de hemácias (seta grossa); C) detalhe das CGM associadas à parede do vaso sanguíneo; D-F) detalhe das CGM em meio a um tecido conjuntivo rico em células “fibroblasto-like” (seta azul) e grande extravasamento de hemácias (seta grossa). HE, objetiva de 40X e 100X.....	57
Figura 5 - Fotomicrografia de LCCG do grupo 2: A-B) Observar nas imagens em menor aumento as CGM (seta fina) exibindo formatos e tamanhos variados dispersos no tecido conjuntivo (TC), contendo hemácias extravasadas (seta grossa) dos vasos; C-F) detalhe das várias formas das CGM, algumas com maior número de núcleos (seta fina) e outras com menor número de núcleos (seta verde). Notar, no tecido conjuntivo (TC), inúmeras células “fibroblasto-like” (seta azul), imagens de mitose (seta vazada) e pequenas áreas de extravasamento de hemácias (seta grossa). HE, objetiva de 40X e 100X.....	59
Figura 6 - Cromatogramas parciais representativos do exon 4 do gene SH3BP2, mostrando a alteração na posição 300 (timina para citosina) em dez pacientes. Note, abaixo, a representação do único paciente que se mostrou heterozigoto nessa posição. n=número de pacientes.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Síntese dos principais estudos genéticos envolvendo querubismo e lesão central de células gigantes.....	34
Tabela 2 - Sequência de primers para a amplificação dos exons do gene SH3BP2 (KS 5' -TGTAACACGACGGCCAGT-3', Rev 5' CAGGAAACAGCTATGACCA-3')	47
Tabela 3 - Critérios utilizados na classificação das LCCG, segundo o comportamento biológico.....	52
Tabela 4- Densidade de volume e número de células gigantes multinucleadas em ambos os grupos.....	61

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

A _T	Área total examinada
A	Adenina (base nitrogenada)
Aai	Fração de área ocupada por perfis do mesmo objeto
C	Citosina (base nitrogenada)
cm	Centímetro(s)
CGM	Células Gigantes Multinucleadas
DAAD	<i>Deutscher Akademischer Austausch Dienst</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
i	Fração de volume ocupada por uma estrutura
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
g	grama(s)
G	Guanina (base nitrogenada)
HE	Hematoxilina + eosina (coloração histológica)
KS	<i>Forward primer</i>
LCCG	Lesão central de células gigantes
mm	Milímetro(s)
mM	Milimolar(es)
mm ²	Milímetro(s) quadrado(s)
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
n	Número de pacientes
n _c	Número de células gigantes multinucleadas
NFAT	Fator Nuclear de Células T Ativadas
NFATc1	Fator Nuclear de Células T Ativadas isoforma c1
ng	Nanograma(s)
Ni	Número de CGM por mm ²
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pi	Número de pontos sobre as células gigantes multinucleadas
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
Pt	Número total de pontos sobre lesão

Rev	<i>Reverse primer</i>
RNA	Ácido ribonucleído
RWTH	<i>Rheinisch-Westfaelische Technische Hochschule</i>
SH3BP2	<i>Src homology 3 binding protein 2</i>
T	Timina (base nitrogenada)
TCG	Tumor de células gigantes
Tcfi	Tecido conjuntivo fibroso
Tcfr	Tecido conjuntivo frouxo
TC	Tecido conjuntivo
U	Unidade(s)
USP	Universidade de São Paulo
UNIFOR	Universidade de Fortaleza
Vvi	Densidade de volume
4p16.3	Subunidade 3 da banda 6 da região 1 do braço curto do cromossomo 4
μL	Microlitro(s)
μM	Micromolar(es)
℃	Grau(s) Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	HISTÓRICO, NOMENCLATURA E CLASSIFICAÇÃO	25
2.2	ETIOPATOGENIA	27
2.3	INCIDÊNCIA	29
2.4	GENÉTICA DA LCCG	30
3	PROPOSIÇÃO	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	SUJEITOS ENVOLVIDOS	41
	DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DA LESÃO (CORTES TECIDUAIS	
4.2	CORADOS EM HE)	42
4.3	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS CGM	42
4.3.1	CASUALIZAÇÃO DOS CAMPOS MICROSCÓPICOS	42
4.3.2	CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO	44
4.3.3	SISTEMA-TESTE UTILIZADO NO ESTUDO MORFOMÉTRICO	44
4.3.4	DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE VOLUME (V_{vi}) DAS CGM	44
4.3.5	DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CGM/mm ² (N_i)	45
4.4	ESTUDO GENÉTICO	46
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	EPIDEMIOLOGIA E CARACTERES CLÍNICOS DA AMOSTRA	51
5.2	ESTUDO MICROSCÓPICO MORFOLÓGICO	54
5.3	ESTUDO MICROSCÓPICO MORFOMÉTRICO	55
5.4	ESTUDO GENÉTICO	64
6	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	73

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A lesão central de células gigantes (LCCG) foi primeiramente descrita por Jaffe (1953) como “granuloma reparador de células gigantes dos maxilares”. É uma afecção intraóssea, reativa, cuja etiopatogenia permanece incerta. Acomete principalmente a mandíbula em idades que variam dos 10 aos 25 anos (DE LANGE *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2009).

Barnes *et al.*, em 2005, classificaram as LCCG como lesões intraósseas de tecido fibroso celular contendo múltiplos focos de hemorragia, agregados de células gigantes multinucleadas e, ocasionalmente, trabéculas de tecido ósseo. A aparência histológica da LCCG é similar à do tumor marrom do hiperparatireoidismo, sendo necessária a realização de exames laboratoriais para sua exclusão. Muito se tem especulado sobre a verdadeira natureza da LCCG. Alguns entendem que se trata de uma neoplasia, pelo caráter agressivo de alguns casos. Outros interpretam como uma resposta a uma irritação ou trauma, que justificaria o nome “reparador” usado no passado. Mas há controvérsias na literatura (CHUONG *et al.*, 1986; EISENBUD *et al.*, 1988; WHITAKER; WALDRON, 1993; DE LANGE; VAN DEN AKKER, 2005; TOSCO *et al.*, 2009).

Questiona-se se as lesões agressivas de crianças são as mesmas que as não agressivas, observadas mais frequentemente em pacientes mais velhos. A única característica comum a ambas são os achados histopatológicos, já que os aspectos clínicos e radiográficos, assim como os sintomas e taxas de recorrência, diferem enormemente, podendo representar, na verdade, uma etiologia distinta. O tipo mais indolente de LCCG pode ser apenas reacional na sua origem, considerando o aparecimento de alguns casos após exodontias ou, mesmo, circundando um implante de titânio (DE LANGE; VAN DEN AKKER, 2005). Apesar de existirem muitos estudos envolvendo LCCG, poucos realizaram análises histomorfométricas na tentativa de estabelecer uma relação do comportamento clínico com as características microscópicas da afecção (FICARRA; KABAN; HANSEN, 1987; AUCLAIR *et al.*, 1988; KRÜSE-LÖSLER *et al.*, 2006). A falta de comparabilidade

demonstra a necessidade de mais investigações em coortes maiores com análises histomorfométricas baseadas em protocolos identicamente padronizados.

O querubismo (MIM 118400) é uma doença rara, indolor, desfigurante, que afeta os ossos maxilares, tendo sido primeiramente descrita por Jones em 1933. São muitos os relatos posteriores sobre querubismo (PETERS, 1979; RIEFKOHL *et al.* 1985; ZACHARIADES *et al.* 1985; ZOHAR *et al.*, 1989; KAUGARS *et al.*, 1992; MARCK; KUDRYK, 1992; PENFOLD *et al.*, 1993; HITOMI *et al.*, 1996; VALIATHAN, PRASHANTH, 1997; SOUTHGATE *et al.*, 1998; MANGION *et al.*, 1999; YAMAGUCHI *et al.*, 1999; TIMOSCA *et al.*, 2000; KOZAKIEWICZ *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2002; SCHULTZE-MOSGAU *et al.*, 2003; BEAMAN *et al.*, 2004; HYCKEL *et al.* 2005; SILVA *et al.*, 2007; JONES; MCGUFF 2009).

A mandíbula e, às vezes, também a maxila, são bilateralmente afetadas, apresentando-se alargadas e provocando um contorno arredondado aos terços médio e inferior da face. A pele sobre as bochechas se estica e puxa para baixo as pálpebras inferiores. Como consequência, uma linha fina de esclera é exposta abaixo da íris e os olhos parecem estar voltados para o céu, lembrando um querubim das pinturas renascentistas (MANGION *et al.*, 1999).

As características clínicas, imaginológicas e histológicas do querubismo podem gerar problemas no diagnóstico diferencial com a LCCG (KERLEY; SCHOW, 1981; FLANAGAN *et al.*, 1988; ZOHAR *et al.*, 1989; KAUGARS *et al.*, 1992; SINGH-WISSMANN; FERRY, 1995).

A maioria dos casos de querubismo são hereditários, com um tipo de herança mendeliana dominante, mas casos isolados já foram relatados (KAUGARS *et al.*, 1992; YAMAGUCHI *et al.*, 1999). Quando o caráter familiar do querubismo não está presente, o diagnóstico diferencial com LCCG fica mais difícil (IMAI *et al.*, 2003). Para alguns autores tanto os casos familiares como os isolados estão relacionadas a uma alteração genética (CARVALHO *et al.*, 2008).

O gene responsável por essa doença foi mapeado no cromossomo 4 (4p16.3) (MANGION *et al.*, 1999; TIZIANI *et al.*, 1999) o qual codifica a proteína adaptadora SH3BP2 (Src Homology-3 Binding Protein-2, MIM 602104) (MANGION *et al.*, 1999; UEKI *et al.*, 2001; MIAH *et al.*, 2004). O querubismo resulta de mutações

germinativas do gene SH3BP2 e, como existe uma forte relação clínica, imaginológica e microscópica entre essa doença e a LCCG, é de se supor que a análise genética possa desempenhar um papel significativo no diagnóstico de LCCG, melhorando a compreensão de sua natureza. Essa suposição já levou alguns autores a investigar a presença de possíveis alterações no gene SH3BP2 em pacientes apresentando LCCG (DE LANGE *et al.*, 2007; LIETMAN *et al.*, 2007; IDOWU *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2009).

Embora mutações não tenham sido encontradas, os trabalhos foram realizados em pequenos grupos de pacientes, ficando, assim, aberta a possibilidade de novas investigações, com maiores amostras, a fim de confirmar, ou não, as informações já existentes.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico, nomenclatura e classificação

Previamente à década de cinquenta, qualquer lesão que possuísse células gigantes em seu interior era genericamente denominada como tumor de células gigantes (TCG), sendo a primeira descrição feita por Cooper e Travers, em 1818. Assim, a lesão central de células gigantes (LCCG) também foi incluída nessa denominação, por apresentar os mesmos tipos celulares. Era vista, inicialmente, como uma lesão maligna. Em 1953, Jaffe sugeriu o termo “granuloma reparador de células gigantes”, pois acreditava que a lesão era reativa e autolimitada e também pelo fato de apresentar diferenças clínicas e histológicas do TCG.

Austin *et al.* (1959) também salientaram algumas diferenças histológicas entre essas afecções e reafirmaram que elas representavam entidades distintas. Segundo os autores, o TCG raramente acometia os maxilares. Em 1966, Waldron e Shafer concluíram que a LCCG e o TCG eram similares e provavelmente idênticos. Tais autores, ao avaliarem a LCCG, sugeriram a não-utilização do termo “reparador”, pois acreditavam que o comportamento clínico da lesão não era compatível com essa designação. Para os autores, não havia evidências de que a lesão representasse uma resposta reparadora. Também somaram-se os fatos de ser uma lesão destrutiva e agressiva, além de não apresentar cura espontânea.

Abrams e Shear (1974) verificaram que as células gigantes dos tumores dos ossos longos eram maiores do que as dos granulomas dos maxilares e que tinham mais núcleos e distribuição mais uniforme. Em 1986, Chuong *et al.*, observaram a presença de filamentos de actina nas lesões agressivas e ausência nas não agressivas. Essa evidência seria outra possível ferramenta para estabelecer o prognóstico da doença. Entretanto, os autores não conseguiram estabelecer uma correlação clara que permitisse prever o comportamento clínico baseado nas imagens histológicas e, por isso, propuseram o nome “lesão central de células gigantes”, podendo ser agressivas e não agressivas. Os autores, assim, classificaram as LCCG de acordo com as manifestações clínicas e radiográficas e os critérios de classificação foram: dor, velocidade de crescimento, tumefação,

reabsorção de raízes, perfuração de cortical e recorrência.

Os trabalhos dirigidos por Cohen (1988) e por Eisenbud (1988) sugeriram que o termo “reparativo” não fosse usado, já que não se aplicava à afecção. Dentre os casos por eles estudados, havia lesões com características tão destrutivas que, para os autores, era impensável considerá-las reparadoras. O termo “reparador” foi então caindo cada vez mais em desuso. Já Auclair *et al.* (em 1988) defenderam que o TCG e a LCCG formavam um processo contínuo da mesma doença, modificado pela idade do paciente, localização e por outros fatores ainda não claramente compreendidos. Em 1989, Eckardt *et al.*, ao estudarem o DNA nuclear das células gigantes de 30 LCCG, agressivas e não agressivas concluíram que tais células não eram determinantes do comportamento biológico das lesões. Abu-El-Naaj *et al.* (2002) afirmaram que é mais prudente considerar que a ocorrência de LCCG em ossos longos, se existe, é muito rara.

A Organização Mundial de Saúde (OMS), segundo Barnes *et al.* (2005), define a LCCG como uma lesão osteolítica benigna, intraóssea, constituída por fibroblastos fusiformes em um estroma contendo colágeno e focos de hemorragia. Ocasionalmente, apresenta trabéculas de tecido ósseo imaturo e células gigantes multinucleadas espalhadas uniformemente, ou agregadas ao redor dos vasos.

As LCCG não agressivas representam a maioria dos casos, apresentam pouco ou nenhum sintoma e são frequentemente descobertas em exames radiográficos destinados a outros fins. São de pequeno tamanho (<5cm), demonstram crescimento lento, não mostram perfuração cortical ou reabsorção radicular e têm baixa tendência a recidiva (CHUONG *et al.*, 1986). Para os autores, as lesões agressivas são caracterizadas pela presença de dor, crescimento rápido, perfuração da cortical, reabsorção radicular e alta tendência à recidiva.

Eisenbud *et al.* (1988) relataram que, dependendo da agressividade da lesão, a abordagem cirúrgica deve ser com maior ou menor grau de invasividade. Os estudos de Whitaker e Waldron (1993) confirmam que o tipo agressivo mostra uma marcante tendência a recorrer após o tratamento. A solução sugerida para esses casos é a ressecção cirúrgica em bloco (BATAINEH; AL-KHATEEB; RAWASHDEH, 2002).

2.2 Etiopatogenia

A etiopatogênese das LCCG dos maxilares é controversa e continuam os debates sobre a possibilidade de representar um processo reacional, infeccioso ou neoplásico (DE SOUZA *et al.*, 1999).

Há uma hipótese etiopatogênica vascular sugerindo que as LCCG pertencem a um espectro de lesões proliferativas vasculares mesenquimais primárias dos maxilares (KABAN *et al.*, 1999; KABAN *et al.*, 2002). Tem sido ainda proposto que representem uma resposta reparadora à hemorragia intraóssea (ITONAGA *et al.*, 2003), embora segundo outra hipótese as LCCG possam representar uma anomalia de desenvolvimento relacionada ao cisto ósseo aneurismático (CHUONG *et al.*, 1986; ITONAGA *et al.*, 2003).

Para Tiffée; Aufdemorte (1997) a natureza da lesão estaria relacionada aos fibroblastos. Eles induziriam a transformação das células mononucleares em células multinucleares, independentemente de origem osteoclástica ou macrofágica. Pogrel *et al.* (1999) acreditam que há similaridade histológica da LCCG com o tumor marrom do hiperparatireoidismo e sugerem a influência de um hormônio semelhante ao paratormônio. Kaban *et al.* (1999) apresentam a hipótese de que a LCCG é fruto de uma proliferação vascular intra óssea. Regezi (2004) relata que as LCCG representam uma resposta reparadora a uma hemorragia e inflamação intraóssea. Segundo o autor, diversas teorias são propostas pela literatura, mas nenhuma é completamente aceita.

Para Bataineh (2002), a etiologia da lesão é desconhecida e o seu comportamento biológico pobremente entendido. Os autores acreditam que sua origem possa estar envolvida tanto com causas locais como sistêmicas. Como causas locais, teríamos o trauma e danos vasculares, os quais produziriam hemorragia intramedular. Como causas sistêmicas, encontram-se na literatura relatos de casos que relacionam o desenvolvimento da LCCG a síndromes, dentre elas: neurofibromatose I (RUGGIERI *et al.*, 1999), síndrome de Noonan (VAN DAMME & MOOREN, 1994) e síndrome de Proteus (COHEN, 1979; COHEN, 2005; NOGUEIRA *et al.*, 2007) e a distúrbios hormonais como o hiperparatireoidismo (FRANCHE *et al.*, 1999) e gravidez (WHITAKER & BOUQUOT, 1994). Há quem

afirme que as LCCG representam tentativas exageradas do tecido conjuntivo no sentido de substituir um hematoma na medula óssea (JAFJE, 1953; ROSEMBERG; NIELSEN, 2001; ABU-EL-NAAJ *et al.*, 2002).

Regezi (2004) relatou que, baseado nas diferenças do comportamento clínico e da resposta ao tratamento, a LCCG se daria, parcialmente, devido à reatividade local e, parcialmente, devido a um processo neoplásico. Itonaga *et al.* (2003), afirmam que a principal porcentagem da atividade proliferativa na LCCG pode ser encontrada na população de células mononucleares, indicada pela expressão de uma proteína específica do ciclo celular. Assim, uma falta de regulação do ciclo celular poderia contribuir para a gênese da LCCG. Para Liu *et al.* (2003), outra dificuldade acerca da etiologia da LCCG é a carência de um entendimento maior da célula de origem e do seu mecanismo molecular, o que é essencial para o desenvolvimento de uma terapêutica específica para a doença.

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

Pogrel (2003) relatou indícios de que alterações genéticas podem estar implicadas na etiologia da LCCG. Sugeriu que as LCCG que se comportam como neoplasmas desenvolvem-se a partir de uma lesão reativa (reparadora) por meio de um evento epigenético. Tal evento ocorre com as células mesenquimais do osso, resultando em perda de controle do ciclo celular, bem como na expressão das proteínas capazes de fazer o recrutamento de monócitos e, também, na sua diferenciação em osteoclastos. Segundo esse pesquisador, estudos moleculares dariam informações significantes sobre esse evento desconhecido, que seria responsável pela iniciação do processo pelo qual se dá o surgimento da LCCG. Teoricamente, obtendo-se o controle sobre a proliferação das células mononucleares, que parecem ser as responsáveis em conduzir essa lesão, poder-se-ia, então, obter a melhor terapia para o paciente. Kaban, Guralnick e Dodson (2003) também consideraram que a exata origem da LCCG, bem como sua biologia,

não estão totalmente elucidadas, razão pela qual ainda não existe tratamento específico.

2.3 Incidência

Há relato de que a LCCG representa aproximadamente 7% de todos os tumores benignos dos maxilares (AUSTIN *et al.*, 1959). A taxa de incidência da lesão é de 1.1/milhão/ano (DE LANGE; VAN DER AKKER; KLIP, 2004). As LCCG podem ocorrer em ampla faixa de idade. Há relatos de casos clínicos em que o acometimento pode-se dar dos dois aos oitenta anos de idade, embora sejam mais comumente encontradas em pacientes jovens. Mais de 60% dos casos acometem indivíduos com menos de 30 anos (REGEZI, 2004). Para Stavropoulos e Katz (2002), em crianças, os maxilares são desenvolvidos com o processo de osteogênese, esfoliação e erupção dos dentes. Esses processos cessam na idade adulta e, por isso, existe uma maior predisposição de a LCCG acometer indivíduos jovens. Há uma discreta predileção por gênero, ocorrendo a maioria dos casos em mulheres (AUCLAIR *et al.* 1988; KRAMER *et al.*, 1991).

Segundo Regezi (2004) a proporção entre mulheres e homens é de 2:1. De Lange e van den Akker (2005), relatando o resultado de tratamento feito numa amostra de 83 pacientes, encontraram um total de 36 pacientes do gênero masculino e 47 do feminino. Vered, Buchner e Dayan (2006) estudaram as LCCG, numa amostra de 41 pacientes, sendo 23 mulheres e 18 homens. Güngörmüş e Akgül (2003) avaliaram 27 casos de LCCG, dos quais 21 eram do gênero feminino e seis, do masculino. Os achados dos estudos acima citados corroboram a literatura estudada, que confirma essa maior prevalência no gênero feminino (AUSTIN; DAHLIN; ROYER, 1959; ANDERSEN; FEJERSKOV; PHILIPSEN, 1973; COHEN; HERTZANU, 1988).

Whitaker e Bouquot (1994), ao avaliarem uma possível influência hormonal nessa lesão, por ser mais frequente em mulheres e por parecer ter um crescimento mais exacerbado na gestação, investigaram a presença de receptores de estrógenos e progesterona em LCCG, mas o resultado foi negativo.

A afecção acomete duas vezes mais a mandíbula do que a maxila (WALDRON; SHAFER, 1966; ANDERSEN; FEJERSKOV; PHILIPSEN, 1973; CHUONG *et al.*, 1986; FICARRA; KABAN; HANSEN, 1987; EISENBUD *et al.*, 1988; COHEN; HERTZANU, 1988; HORNER, 1989; WHITAKER; WALDRON, 1993; KAFFE *et al.*, 1996). Cerca de 25% encontram-se na maxila, com igual frequência nas regiões anterior e posterior (KAFFE *et al.*, 1996), embora existam controvérsias (TOSCO, 2009). Em 1966, Waldron e Shafer reportaram que as LCCG tendem a ocorrer mais na região anterior de ambos os maxilares, principalmente na área dos dentes decíduos, cruzando a linha média em 21% dos casos, fato muito descrito no passado (AUSTIN; DAHLIN; ROYER, 1959; WALDRON; SHAFER, 1966; WHITAKER; WALDRON, 1993; SIDHU; PARKASH; SIDHU, 1995; MINIC; STAJCIC, 1996).

Güngörmüs e Akgül (2003) avaliaram 27 casos de LCCG, dos quais 15 acometiam a mandíbula e 12, a maxila. Vered *et al.* (2006), ao estudarem 41 casos de LCCG, constataram que 19 lesões se localizavam na maxila e 21, na mandíbula. Esses resultados corroboraram a literatura, que aponta para maior acometimento na mandíbula.

Para Whitaker e Waldron (1993) as lesões ficam confinadas nas margens dos dentes, e a região mais acometida dos maxilares é a porção anterior da mandíbula. Para Regezi (2004), raramente tais lesões envolvem a região posterior dos maxilares, incluindo o ramo mandibular e o côndilo. Na maxila, a maioria das lesões ocorre na região anterior e, devido a suas características anatômicas específicas, o diagnóstico, o progresso, a direção de crescimento e seu prognóstico são bem característicos. A qualidade do osso maxilar e sua fina cortical permitem que a lesão se expanda mais facilmente (RAWASHDEH; BATAINEH; AL-KHATEEB, 2006).

2.4 Genética da LCCG

O tratamento dessa afecção é muito variável e existem, na literatura, relatos de curetagem (DE LANGE *et al.*, 1999; POGREL *et al.*, 1999; O'REGAN; GIBB; ODELL, 2001; KABAN; TROULIS, 2002; POGREL, 2003), ressecção cirúrgica em bloco (ADORNATO *et al.*, 2001; BATAINEH *et al.*, 2002; REGEZI, 2004; KRÜSE-LÖSLER *et al.*, 2006), infiltrações com corticoesteróides (JACOWAY; HOWELL;

TERRY, 1988; TERRY; JACOWAY, 1994; KERMER; MILLESI; WATZKE, 1994; RAJEEVAN; SOUMITHRAN, 1998; KURTZ, MESA, ALBERTO, 2001; CARLOS; SEDANO, 2002; ABDO *et al.*, 2005; NOGUEIRA *et al.*, 2010), calcitonina (HARRIS, 1994; DE LANGE *et al.*, 1999; O'REGAN; GIBB; ODELL, 2001; KABAN *et al.*, 2002; POGREL, 2003; REGEZI, 2004), interferon alfa (KABAN *et al.*, 2002), entre outros menos preconizados (REGEZI, 2004). O aprofundamento nas pesquisas, visando a elucidar a sua etiopatogenia pode valorizar ou, mesmo, criar protocolos conservadores de tratamento que minimizem, ou eliminem, procedimentos cruentos e mutilantes. Nesse contexto, estudos genéticos têm sido um importante enfoque dessa afecção.

O gene responsável pelo querubismo foi descoberto em 2001, no braço curto do cromossomo 4 (4p16.3), e nomeado SH3BP2 (SH3-domain binding protein 2) (UEKI *et al.*, 2001). A mutação desse gene tem sido estudada em indivíduos com LCCG porque ambas as doenças apresentam similaridades clínicas, radiográficas e histopatológicas. Tal mutação leva a uma superexpressão do gene, resultando em lesões de células gigantes, que são histologicamente similares às encontradas nas LCCG (MIAH *et al.*, 2004; HYCKEL *et al.*, 2005).

A proteína SH3BP2, codificada pelo respectivo gene, estimula a atividade de Fator Nuclear de Células T Ativadas (NFAT) e Fator Nuclear de Células T Ativadas isoforma c1 (NFATc1), um importante fator de transcrição na osteoclastogênese (LIETMAN; YIN; LEVINE, 2008).

Amaral *et al.* (2010) estudaram em lesões de células gigantes a imunoexpressão de NFATc1 (cinco casos de lesões periféricas e cinco, de lesões centrais). Esses pesquisadores encontraram positividade para NFATc1 no núcleo das células gigantes, além de superexpressão da proteína SH3BP2 nas lesões estudadas, sugerindo que o desenvolvimento das lesões de células gigantes pode ser relacionado à expressão de NFATc1 no núcleo das células gigantes.

O querubismo é frequentemente diagnosticado precocemente e suas características clínicas diferenciais são a bilateralidade e a ocorrência em vários membros da família. Entretanto, a sua apresentação inicial unilateral, o diagnóstico

tardio e a ausência de história familiar têm sido relatados (MENG; YU; YU, 2005; ARNOTT, 1978), dificultando a diferenciação com LCCG.

De Lange *et al.* (2007), fizeram uma análise de DNA constitucional para o exon 9 do gene SH3BP2 em quatro pacientes com LCCG agressivas (que apresentaram dor, parestesia, crescimento rápido e/ou reabsorção radicular), sem o fenótipo do querubismo. A análise de DNA mostrou ausência de mutações no exon estudado nesses pacientes, sugerindo que o querubismo é uma entidade separada. Entretanto, os autores sugerem que uma mutação somática em um grupo específico de células pode causar lesões focais de LCCG. Seguindo desse estudo, Lietman *et al.* (2007), estudaram o exon 9 em 10 pacientes com TCG e em nove pacientes portadores de LCCG e nenhuma alteração molecular foi encontrada. Além disso, eles demonstraram que a transcrição de mRNA codificando SH3BP2 e sua transcrição proteica, assim como os níveis de NFATc1 em forma proteica, se encontravam em níveis elevados em LCCG. Os autores sugeriram, com este estudo, que, uma possível mutação relacionada à LCCG no gene SH3BP2 estaria fora do exon 9. Idowu *et al.*, em 2008, também não encontraram mutações no exon 9 do gene SH3BP2 numa análise de 15 pacientes com LCCG.

Ueki *et al.* (2007) sugeriram que o gene SH3BP2 pode estar envolvido na regulação da atividade de osteoclastos e osteoblastos. Além disso, mutações nesse gene podem levar a uma disfunção na proteína SH3BP2, especificamente a uma ativação patológica dos osteoclastos (HYCKEL *et al.*, 2005; IDOWU *et al.*, 2008).

A proteína adaptadora SH3BP2 contém três domínios modulares peptídicos de reconhecimento, um domínio homólogo de *pleckstrina* N-terminal (PH), um sítio de ligação a SH3 de dez aminoácidos e um domínio C-terminal SH2 (BELL *et al.*, 1997). Até 2008, todas as mutações identificadas foram detectadas no exon 9 e afetavam três aminoácidos dentro de uma sequência de seis (RSPPDG) localizados nos aminoácidos 31-36 acima do domínio SH2 e os aminoácidos 205-210 abaixo do domínio de ligação a SH3 (UEKI *et al.*, 2001).

Uma mutação no SH3BP2 foi descrita no exon 9 em um caso de querubismo não-familiar (IMAI *et al.*, 2003) e também uma mutação no exon 3 em um caso esporádico e agressivo de querubismo (CARVALHO *et al.*, 2008). Carvalho *et al.*

(2009), reportaram ainda um caso de querubismo com uma mutação no exon 4 e, pela primeira vez, uma mutação somática em um paciente portador de LCCG no exon 11. Nesse estudo, quatro pacientes com LCCG localizadas na mandíbula, foram estudados. A mutação no exon 11 foi encontrada em um paciente com uma lesão radiolúcida unilocular não agressiva, o que sugere a possibilidade de haver uma correlação entre a mutação encontrada e o fenótipo expresso pelo paciente. (Uma síntese dos trabalhos mais importantes, até então publicados, com análise genética de querubismo e LCCG encontra-se na tabela 1).

Tabela 1 – Síntese dos principais estudos genéticos envolvendo querubismo e lesão central de células gigantes.

Doença	Referência	Número de casos	Mutação no gene <i>SH3BP2</i>
Querubismo	Tiziani <i>et al.</i> , 1999	Três gerações de uma família e três outras famílias	Estabeleceu a correlação com o cromossomo 4p16
Querubismo	Mangion <i>et al.</i> , 1999	2 famílias	Forte evidência para a localização do gene do querubismo no cromossomo 4p16
Querubismo	Ueki <i>et al.</i> , 2001	15 famílias (66 indivíduos)	Primeiras mutações encontradas no exon 9 afetando três aminoácidos em uma sequência de 6 (RSPPDG)
Querubismo	Imai <i>et al.</i> , 2003	1 paciente	Mutação no exon 9 (primeiro estudo a demonstrar a presença da mesma mutação descrita no querubismo hereditário em um caso não-familiar)
Querubismo	Lo <i>et al.</i> , 2003	1 família	Mutação no exon 9
Querubismo	Hyckel <i>et al.</i> , 2005	2 pacientes	Mutação no exon 9
Querubismo	Lietman <i>et al.</i> , 2006	1 paciente	Mutação no exon 9
Querubismo	Li; Yu, 2006	1 família (21 membros)	Mutação no exon 9
Querubismo	de Lange <i>et al.</i> , 2007	1 família (11 membros)	Mutação no exon 9. Em um homem e uma mulher a mutação estava presente sem sinais e sintomas. Isso pode indicar que a mutação no querubismo não tem 100% de penetrância nos homens.
LCCG	Lietman <i>et al.</i> , 2007	10 TCG e nove LCCG	Ausência de mutação
LCCG	de Lange <i>et al.</i> , 2007	4 pacientes	Ausência de mutação no exon 9
LCCG	Idowu <i>et al.</i> , 2008	15 LCCG 11 LPCG	Ausência de mutação no exon 10
Querubismo	Lee <i>et al.</i> , 2008	1 paciente afetado e sua família	Mutação no exon 9
Querubismo	Carvalho <i>et al.</i> , 2008	1 paciente	Mutação no exon 3
Querubismo /LCCG	Carvalho <i>et al.</i> , 2009	1 paciente - querubismo 4 pacientes – LCCG	Mutação no exon 4 (querubismo) Mutação no exon 11 (LCCG)

Percebe-se, pela revisão da literatura e pela análise da tabela 1, que o assunto está aberto a novas investigações, preferencialmente com casuísticas maiores do que as apresentadas até o momento.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

- 1- Avaliar a possível relação do número de células gigantes multinucleadas (CGM) e da densidade de volume de CGM com a agressividade da lesão central de células gigantes (LCCG);
- 2- Investigar a presença de mutações nos 13 exons do gene SH3BP2 de pacientes portadores de LCCG.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Sujeitos envolvidos

De uma população de 42 pacientes portadores de LCCG, 25 compuseram a amostra, sendo uma parte deles do serviço de cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial do Hospital Batista Memorial (Fortaleza/CE/Brasil) e outra parte, do serviço de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo (FOB-USP/Bauru/SP/Brasil). Todos forneceram seu consentimento livre e esclarecido, por escrito, sendo o projeto aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Os espécimes utilizados no estudo pertencem ao Laboratório de Patologia Bucal do curso de Odontologia da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) e ao Laboratório de Patologia da FOB-USP, onde os diagnósticos microscópicos foram confirmados. O estudo de biologia molecular foi realizado no hospital universitário da Rheinisch-Westfaelische Technische Hochschule (RWTH) - Aachen (Alemanha).

Fizeram parte da amostra aqueles pacientes cujos dados arquivados contivessem: identificação completa, informações clínicas sobre a existência ou não de sintomatologia, descrição de sinais clínicos e exames imaginológicos com radiografias panorâmicas e oclusais ou tomografia computadorizada, tanto iniciais como de acompanhamento do tratamento.

Foram excluídos da amostra pacientes portadores de querubismo e de hiperparatireoidismo, diagnosticados por meio de análises da história familiar, história clínica, diagnóstico por imagem e exames laboratoriais (dosagem de paratormônio, fosfatase alcalina, cálcio e fósforo).

Em fichas especiais, foram tabulados os dados clínicos, radiográficos e microscópicos morfológicos, para posterior computação e análise. Os critérios microscópicos morfológicos seguiram pesquisas anteriores (CHUONG *et al.*, 1986; FICARRA; KABAN; HANSEN, 1987; O'MALLEY *et al.*, 1997; KRÜSE-LÖSLER *et al.*, 2006; VERED *et al.*, 2007). Os portadores de lesões agressivas e não agressivas

foram separados em grupos 1 e 2, respectivamente, respeitando os seguintes critérios de agressividade: referência a dor, referência a evolução rápida, perfuração de cortical radiograficamente, precisão ou não de limites e reabsorções radiculares e recidiva após tratamento por curetagem ou ressecção (CHUONG *et al.*, 1986).

4.2 Descrição morfológica da lesão (cortes teciduais corados em HE)

Os cortes histológicos foram analisados por um professor de patologia calibrado para tal, em um microscópio Axioscope 2 (Carl Zeiss, Alemanha). Na análise microscópica procurou-se observar: a) organização tecidual da lesão; b) organização do tecido conjuntivo (frouxo ou fibroso); c) as características dos tipos celulares mononucleares (distribuição, forma e atividade proliferativa através das figuras de mitose) presentes no tecido conjuntivo; d) vascularização e a presença e intensidade de focos hemorrágicos; e) características morfológicas das CGM (forma, tamanho e número de núcleos); f) distribuição e organização das CGM na lesão; g) presença de tecido ósseo e de osteoclastos em sua superfície; e h) presença de infiltrado inflamatório.

4.3 Análise morfométrica das CGM

4.3.1 Casualização dos campos microscópicos

Todos os métodos estereológicos são baseados em princípios geométricos (estatísticos), derivados da probabilidade de que imagens dos perfis da estrutura na secção histológica coincidam com um sistema-teste apropriado. Desse modo, o ponto central nesses métodos está na casualização das amostras, ou seja, a escolha das amostras do tecido a serem confrontadas com o sistema-teste. Essa escolha deve ser realizada por meio de um método que elimine a ocorrência de vício na amostragem, o que é conseguido pela aplicação do procedimento de casualização no processo de seleção dos campos microscópicos a serem utilizados nas quantificações.

Para cada lesão, havia seis, ou mais, lâminas coradas pelo HE, contendo um corte semisseriado de 5 μm . Por meio de sorteio, foram escolhidos dois cortes histológicos. De cada corte, foram avaliados 50 campos microscópicos, selecionados por um esquema de casualização sistemática (Figura 1), segundo as indicações de Weibel (1969). Vale salientar que, nesse esquema, os campos microscópicos são escolhidos em intervalos regulares, de maneira que todas as regiões do corte histológico sejam representadas.

Figura 1: Esquema de casualização dos 50 campos microscópicos para cada corte histológico analisado.

4.3.2 Critérios de avaliação

O estudo morfométrico foi realizado pela pesquisadora responsável, após calibração em ensaio-piloto. Foram consideradas como CGM somente as células que continham 3 ou mais núcleos (Figura 2).

Figura 2: Imagens consideradas como CGM (circundadas em azul) durante o estudo morfométrico.

4.3.3 Sistema-teste utilizado no estudo morfométrico

Foi utilizado um microscópio Olympus com objetiva de 40x e ocular Kpl 10x Zeiss, contendo um retículo de integração II Zeiss, constituído por 10 linhas paralelas e 100 pontos simetricamente distribuídos dentro de uma área quadrada (Figura 3).

4.3.4 Determinação da densidade de volume (Vvi) das CGM

A densidade de volume (Vvi) foi avaliada pela técnica de volumetria relativa de contagem de pontos (WEIBEL, 1969) sendo a mesma definida como a fração de volume do todo ocupada por um determinado constituinte do todo, no caso, as CGM. Esse método é baseado em princípios básicos nos quais a fração de volume ocupada por uma estrutura (i) é proporcional à fração de área ocupada por perfis do mesmo objeto, sendo: $V_{vi} = A_{ai}$. A fração de área foi determinada colocando-se

sobre a amostra o sistema-teste (Figura 3), anotando o número de pontos sobre as células gigantes multinucleadas (Pi) e o número total de pontos sobre lesão (Pt). A densidade de volume das células gigantes foi calculada pela seguinte relação: $V_{vi} = P_i/P_t$. A densidade de volume (V_{vi}) foi expressa em porcentagem.

4.3.5 Determinação do número de CGM/mm² (Ni)

O número de CGM/mm² da lesão (Ni) foi determinado utilizando o mesmo sistema-teste e os mesmos campos analisados no item anterior. Em cada campo, foi contado o número de CGM (n_c) contidos no interior e os que cortavam os lados esquerdo e inferior do retículo, conforme ilustrado na figura 3. O número de CGM por mm² da lesão (Ni) foi calculado pela fórmula $N_i = n_c/A_T$, sendo que A_T = área total examinada (área do sistema teste em mm² x número total de campos examinados).

Figura 3: Imagem do sistema-teste sobreposto a uma área da lesão (um campo de contagem) exibindo $P_i = 22$ e $N_c = 4$.

4.4 Estudo genético

Sangue venoso periférico foi coletado dos 25 pacientes portadores de LCCG, após seu consentimento livre e esclarecido. O material foi armazenado em tubos contendo EDTA e se destinava a estudo da mutação do gene SH3BP2 (Src homology 3 binding protein 2). Utilizaram-se técnicas de amplificação (PCR) e sequenciamento do gene-alvo. Também foi realizado estudo em tecido, a partir de espécimes incluídos em parafina.

No material oriundo do sangue venoso periférico, o DNA genômico foi extraído usando-se o QIAmp DNA Mini Kit, segundo instruções do fabricante. As amostras de DNA foram congeladas a -70°C e transportadas, em gelo seco, do Brasil para a Alemanha.

Do material em blocos de parafina, o DNA foi extraído das 25 amostras e purificado com o QIAmp DNA Mini Kit usando-se o “protocolo de tecido” (QIAGEN/Hilden/Alemanha) segundo as instruções do fabricante com uma modificação: 0,8g de esferas de zirconia-silica (0,1mm de diâmetro; BioSpec/Bartlesville/OK/EUA) foram acrescentadas antes da adição da proteinase K. As amostras foram agitadas em um FastPrep FP 120 (Qbiogene/Carlsbad/CA/EUA) a 6,5m/s por 45s. Todos os passos subsequentes seguiram o protocolo original.

Como a amplificação pelo PCR, a partir do DNA extraído do material em parafina, não foi satisfatória, 10 μl do DNA extraído foram carregados em um gel de agarose a 1% e separados através da eletroforese. A banda de DNA de maior peso molecular foi colhida do gel e uma nova extração foi realizada, utilizando-se o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN/Hilden/Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante.

A concentração de DNA (A_{260}) e sua pureza (A_{260}/A_{280}) foram checadas usando-se um Gene Quant II photometer (Pharmacia Biotech/Cambridge/Inglaterra).

O presente estudo utilizou dezessete pares de *primers*, desenhados com base na sequência do gene SH3BP2, para amplificação por meio da PCR, para todos os treze exons (Tabela 2). Para PCR, cada reação continha 0,5U de Taq polimerase com o tampão para PCR (Roche Applied Science/Penzberg/Alemanha),

0,2mM dNTPs (Roche Applied Science/Penzberg/Alemanha), 0,5µM de cada *primer* e 1µL da amostra de DNA (aproximadamente 25ng). A amplificação foi obtida com um volume total de 50µL em tubos para reação de PCR, usando-se a Eppendorf Mastercycler (Eppendorf/Hamburg/Alemanha).

Tabela 2 - Sequência de *primers* para a amplificação dos exons do gene SH3BP2 (KS 5' - TGTAACACGACGGCCAGT-3', Rev 5' CAGGAAACAGCTATGACCA-3').

Primer	Sequência do primer	Tamanho do produto (pb)
Exon1F	5'-KS-TTGCAGCGTGGGGAAACTGA-3	470
Exon1R	5'-Rev-TTGTCCCCCAAGAAGCGCGT-3	
Exon2F	5'-KS-TCAGACATCTCCTGCCTGACC-3	259
Exon2R	5'-Rev-CTTACATGGCTAGCCCTGCC-3	
Exon3F	5'-KS-AGGGTCCTCACAGTGGGTCTT-3	289
Exon3R	5'-Rev-GCTTCGGGAAAGCACTTTCC-3	
Exon4F	5'-KS-GGCCATCCCTATAGCTGTGA-3	214
Exon4R	5'-Rev-ACACCCCCAGTCACCTTGCA-3	
Exon5F	5'-KS-ACCTTGGGAGTCACAGCAGA-3	276
Exon5R	5'-Rev-CGGAATTCTATGCCAAGCCC-3	
Exon6F	5'-KS-GTGTGAGCATCAAGGGACCTC-3	257
Exon6R	5'-Rev-CAAGGAGCACAGCCGAACACA-3	
Exon7F	5'-KS-TGGAGCATTGCTCGGAGACT-3	182
Exon7R	5'-Rev-TGCTTCCTACACACCCAGAG-3	
Exon8-1F	5'-KS-TAGTGTTGGCCCAGTCTCTG-3	284
Exon8-1R	5'-Rev-TAGCAGGTACCCTGGGGCAA-3	
Exon8-2F	5'-KS-CTAAGCACGGCCTCCCAGAT-3	348
Exon8-2R	5'-Rev-TTGTGGCTGGCACAGGTGG-3	
Exon8-3F	5'-KS-ACTGCACCTTCCAGAACTGTG-3	319
Exon8-3R	5'-Rev-CCAGGGTCCCTGTAGCTGGA-3	
Exon9F	5'-KS-CCGTGTCTGACAGTGAAATGG-3	222
Exon9R	5'-Rev-ATGGCTTTCCCACCACCTGT-3	
Exon10F	5'-KS-GGGTGGATCACTCCGACGTT-3	165
Exon10R	5'-Rev-GACACAGAAGCAGGAAGCCG-3	
Exon11F	5'-KS-AAGGTCCGTGTGAAAGCTGCC-3	201
Exon11R	5'-Rev-ACAGCCTGGGTGTGTGGAGA-3	
Exon12F	5'-KS-GCTGGTCCCGCTGTTTCTCA-3	197
Exon12R	5'-Rev-GCCTATGCCTCATCAGGGAGA-3	
Exon13-1F	5'-KS-TTACAGACGGGGAGACTGAGG-3	322
Exon13-1R	5'-Rev-CAGCCTTGCTCCTGCTCACC-3	
Exon13-2F	5'-KS-AGGTGATGGCAGTCCATGTGG-3	311
Exon13-2R	5'-Rev-GGGACCAAGTGTTCCTGTCCTT-3	
Exon13-3F	5'-KS-CACTAACTTGCCCTGTCCCAA-3	298
Exon13-3R	5'-Rev-CTTAGACATCAGCATGGGCACC-3	

*Fonte: IMAI *et al.*, 2003.

As condições de ciclagem foram: 94°C por 1 minuto, seguido de 37 ciclos a 94°C por 30 segundos, 57°C por 40 segundos e 72°C por 50 segundos, finalizando com um único passo de extensão a 72°C, seguido de resfriamento gradual até 4°C (IMAI *et al*, 2003). Em alguns casos (exons 4, 7 e 13), nenhum produto foi obtido com essas condições para o DNA extraído das amostras de sangue e a temperatura de anelamento teve então que ser diminuída até chegar a um mínimo de 54°C. As amostras de tecido que não mostraram amplificação com as condições adotadas foram submetidas a uma reação de PCR em tempo real, utilizando-se 95°C por 10 segundos, seguidos por 50 ciclos de 95°C por 10 segundos, 56°C por 10 segundos e 72°C por 20 segundos.

As alíquotas dos *amplicons* (10µL) foram examinadas através de eletroforese e purificadas usando-se o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN/Hilden/Alemanha). O sequenciamento bidirecional dos *amplicons* purificados foi realizado utilizando-se o Kit de ciclo de sequenciamento Big Dye-Deoxy terminator (Applied Biosystems/Foster City/CA/EUA) e um capilar automático para sequenciamento do DNA (API Prism 310; Applied Biosystems). A qualidade de todos os sequenciamentos foi visualmente analisada utilizando-se o *software* Vector NTI Advance 9.0 (Invitrogen Life Science Software/MD/EUA). A identificação das sequências dos exons do gene-alvo foram confirmadas através de busca nas bases de dados internacionais de sequenciamento, utilizando-se o programa *Blast* (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

4.5 Análise estatística

Os dados morfométricos relativos a densidade de volume e ao número de CGM/mm² foram submetidos ao teste “t” de Student não pareado, após passar pelos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e D’Agostino & Pearson, tendo sido adotado como nível de significância $p \leq 0,05$.

5 Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Epidemiologia e caracteres clínicos da amostra

Segundo Austin *et al.* (1959), a LCCG representa menos de 7% de todos os tumores benignos dos maxilares, mas dados relativos à sua ocorrência são escassos na literatura. De Lange, Van Der Akker e Klip (2004), num estudo epidemiológico realizado com a população da Holanda, encontraram uma incidência de 0,00011%. Como não há estudos similares em outras populações, estima-se que esse número representa uma incidência aproximada da LCCG em outros locais.

Essa baixa incidência dificulta um maior entendimento da lesão, uma vez que não existem estudos com amostras representativas e seria necessário um estudo com um grande número de casos, para a avaliação das características específicas dos tipos agressivo e não agressivo, separadamente. A baixa incidência valoriza também o número de casos englobados nesse estudo, pois, embora o número de 25 pacientes seja pequeno quando discutimos grande parte das doenças que acometem a região maxilofacial, é um número bastante representativo quando tratamos de LCCG submetidas à análise de biologia molecular, visto que a literatura apresenta relatos de pequena casuística (DE LANGE *et al.*, 2007; LIETMAN *et al.*, 2007; IDOWU *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.* 2009).

Dos 25 pacientes incluídos nesse estudo, 11 (44%) apresentaram lesão em maxila e 14 (56%), em mandíbula. A região posterior da mandíbula mostrou uma maior prevalência, com 8 casos. Treze (52%) pacientes eram do sexo masculino e 12 (48%), do sexo feminino, sem predileção evidente por nenhum dos sexos. Em relação à agressividade, dez (40%) pacientes apresentaram lesões agressivas (grupo 1) e 15 (60%) tiveram suas lesões classificadas como não agressivas (grupo 2). Os critérios utilizados para a classificação foram os estabelecidos por Chuong *et al.* (1986) (tabela 3).

Tabela 3 - Critérios utilizados na classificação das LCCG, segundo o comportamento biológico.

<i>Paciente</i>	<i>Idade</i>	<i>Raça</i>	<i>Localização</i>	<i>Dor</i>	<i>Velocidade crescimento</i>	<i>Deslocamento dentário</i>	<i>Reabsorção radicular</i>	<i>Perfuração da cortical</i>	<i>Comportamento biológico</i>
Masculino	20	Parda	Maxila	Sim	Rápido	Não	Não	Sim	Agressivo
Masculino	07	Parda	Mandíbula	Não	Lento	Sim	Não	Não	Não agressivo
Feminino	23	Branca	Mandíbula	Não	Rápido	Sim	Sim	Sim	Agressivo
Masculino	20	Parda	Maxila	Não	Lento	Não	Não	Não	Não agressivo
Feminino	19	Branca	Mandíbula	Não	Lento	Sim	Não	Não	Não agressivo
Masculino	08	Parda	Mandíbula	Não	Rápido	Sim	Não	Sim	Agressivo
Masculino	05	Parda	Maxila	Não	Rápido	Sim	Não	Sim	Agressivo
Feminino	15	Branca	Mandíbula	Sim	Rápido	Sim	Não	Sim	Agressivo
Masculino	11	Branca	Mandíbula	Não	Lento	Sim	Não	Não	Não agressivo
Feminino	24	Branca	Maxila	Não	Lento	Não	Não	Não	Não agressivo
Masculino	25	Branca	Mandíbula	Não	Lento	Não	Não	Não	Não agressivo
Feminino	20	Branca	Mandíbula	Sim	Rápido	Sim	Não	Sim	Agressivo
Masculino	07	Branca	Maxila	Não	Rápido	Sim	Não	Não	Não agressivo
Feminino	09	Negra	Maxila	Não	Lento	Não	Não	Não	Não agressivo
Masculino	25	Branca	Mandíbula	Não	Rápido	Não	Não	Sim	Não agressivo
Feminino	10	Negra	Mandíbula	Não	Lento	Sim	Não	Não	Não agressivo
Feminino	18	Branca	Mandíbula	Não	Rápido	Sim	Não	Sim	Agressivo
Feminino	23	Parda	Maxila	Sim	Rápido	Sim	Não	Sim	Agressivo
Masculino	06	Branca	Maxila	Sim	Rápido	Sim	Não	Sim	Agressivo
Masculino	13	Parda	Maxila	Não	Rápido	Sim	Sim	Sim	Agressivo
Feminino	17	Branca	Mandíbula	Não	Lento	Não	Não	Não	Não agressivo
Feminino	12	Parda	Maxila	Não	Lento	Sim	Não	Não	Não agressivo
Feminino	12	Parda	Maxila	Não	Lento	Sim	Não	Não	Não agressivo
Masculino	09	Branca	Mandíbula	Não	Lento	Sim	Não	Não	Não agressivo
Masculino	15	Parda	Mandíbula	Não	Lento	Sim	Não	Não	Não agressivo

* Critérios utilizados por CHUONG *et al.*, 1986.

A idade dos pacientes relatados no presente estudo variou de 5 a 25 anos, o que está em acordo com a literatura, que afirma que, muito embora a lesão possa ocorrer em qualquer idade, acomete principalmente pessoas nas três primeiras décadas de vida (AUCLAIR *et al.*, 1988; KRAMER *et al.*, 1991; KAFFE *et al.*, 1996; POGREL *et al.*, 1999; REGEZI, 2004). Porém, o comportamento biológico variado das LCCG sugere que a predileção de faixa etária é questionável, visto que lesões assintomáticas passam anos sem ser identificadas, enquanto lesões sintomáticas

são rapidamente diagnosticadas.

A casuística apresentada nesse estudo é de 12 pacientes do gênero feminino e 13 do gênero masculino, embora alguns autores afirmem haver uma discreta predileção pelo gênero feminino (AUCLAIR *et al.* 1988; KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1991). Porém, dos 42 casos que compuseram a população desse estudo, essa predileção pelo gênero feminino pôde ser observada, com 27 casos acometendo mulheres. De acordo com O'Regan *et al.* (2001), o rápido crescimento das LCCG durante o período de gestação resulta de um estímulo numa lesão preexistente e não o estímulo ao aparecimento de uma nova lesão. Essa relação hormonal, somada ao fato de a lesão ser mais frequente em mulheres, faz com que alguns autores (WHITAKER; BOUQUOT, 1994) desconfiem de que hormônios femininos desempenhem algum papel nessa lesão. Estrógenos e progesterona possivelmente influenciam outras lesões vasculares, embora o papel desses hormônios não seja totalmente estabelecido. Das 12 pacientes do presente estudo, apenas uma estava grávida no momento do diagnóstico e nenhuma das outras pacientes tinha filhos ou histórico de gravidez. De acordo com Whitaker e Bouquot (1994), não havia a presença de receptores para estrógenos ou progesterona na superfície da LCCG. Sabe-se que tais hormônios têm um efeito imunossupressor (WHITAKER; BOUQUOT, 1994), o que pode predispor ao aparecimento, em alguns casos, de LCCG. Outra possível causa especulada é a presença dos inúmeros fatores de crescimento circulantes durante a gravidez, mas essas hipóteses carecem de confirmação e necessitam de investigações mais profundas. Embora a influência hormonal não tenha sido o foco do nosso estudo, parece-nos plausível a hipótese de que os fatores de crescimento possam estar envolvidos na causa, porque os 25 pacientes estavam em fase de crescimento ou o crescimento cessara havia pouco. Eram 25 pacientes jovens (média de 15,1 anos para o grupo 1 e 14,8 anos para o grupo 2).

Quanto à localização das LCCG, a literatura revisada afirma que acometem principalmente a mandíbula, numa proporção de 2:1 (AUCLAIR, *et al.*, 1988; KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1991; DE LANGE & VAN DEN AKKER, 2005) sendo que, em alguns estudos, as lesões são reportadas acometendo 3 vezes mais a mandíbula que a maxila (WHITAKER; WALDRON, 1993; KAFFE *et al.*, 1996; KURTZ; MESA; ALBERTO, 2001). A casuística do presente trabalho apresenta 14

casos envolvendo a mandíbula e 11 a maxilla, estando, de forma geral, em consonância com a literatura. Lesões que acometem a maxila são mais comuns nas porções anteriores, ficam confinadas na região dos dentes e frequentemente cruzam a linha média da face (VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006). Seis casos da nossa casuística apresentaram-se na região anterior da maxila, cruzando a linha média. Os demais casos que envolveram a maxila ficaram limitados à hemiface esquerda ou à direita. Aspectos anatômicos ósseos da maxilla como delgada espessura das corticais e a vizinhança da boca com os espaços aéreos e órbitas influenciam o prognóstico e o tratamento da LCCG (RAWASHDEH; BATAINEH; AL-KHATEEB, 2006). Tal afirmativa permite entender o porquê de as recidivas serem mais frequentes na maxila do que na mandíbula. Em nossa casuística, um dos casos de maxila invadia a fossa nasal e dificultava a respiração do paciente.

5.2 Estudo microscópico morfológico

Os resultados morfológicos dos cortes teciduais obtidos das LCCG, corados pela HE, estão representados nas figuras 4 e 5.

O exame microscópico das LCCG evidenciou, de modo geral, áreas de tecido conjuntivo frouxo, contendo poucas fibras colágenas, grande quantidade de vasos sanguíneos e células semelhantes a fibroblastos, algumas exibindo figuras de mitose, extravasamento de hemácias e pigmentos de hemossiderina; estes mais intensos no grupo 1 (Figura 4A-F). A característica marcante dessas áreas era a presença das CGM, que exibiam formas, número de núcleos e tamanhos variados, sendo algumas de formato irregular. Na maioria das vezes, encontravam-se associadas à parede dos vasos sanguíneos ou circundavam pequenas áreas contendo grande concentração de hemácias. Nesse caso, alguns vasos sanguíneos mostravam-se com sinais de rompimento da parede. Já as CGM de formato mais circular, podiam ser facilmente observadas em regiões que apresentavam tecido conjuntivo celularizado, amplo citoplasma, núcleo ovoide e eucromático. Fibras colágenas estavam dispostas aleatoriamente, circundando pequenos focos de extravasamento de hemácias. Grupo 2. (Figura 5A-F).

Em alguns espécimes, havia áreas de tecido conjuntivo fibroso, contendo focos hemorrágicos e algumas células mononucleadas, contendo hemossiderina

fagocitada. Raras CGM tinham formato alongado, apresentando citoplasma reduzido, com intensa eosinofilia e núcleos pequenos e heterocromáticos.

5.3 Estudo microscópico morfométrico

O confronto estatístico dos resultados morfométricos obtidos para as CGM das lesões agressivas e não agressivas (tabela 4) mostrou que a densidade de volume das CGM no grupo 1 foi maior em relação ao grupo 2 ($p=0,013$), porém o número de CGM/mm² embora maior no grupo 1, não teve diferença estatisticamente significativa ($p=0,245$), indicando que as CGM no grupo 1 são mais volumosas em relação ao grupo 2.

Figura 4: Fotomicrografia de LCCG do grupo 1. A-B) Observar nas imagens em menor aumento as CGM (seta fina) exibindo formatos e tamanhos variados dispersas no tecido conjuntivo, contendo vasos calibrosos (seta vazada) e extravasamento de hemácias (seta grossa); C) detalhe das CGM associadas à parede do vaso sanguíneo; D-F) detalhe das CGM em meio a um tecido conjuntivo rico em células “fibroblasto-like” (seta azul) e grande extravasamento de hemácias (seta grossa). HE, objetiva de 40X e 100X.

Figura 5: Fotomicrografia de LCCG do grupo 2: A-B) Observar nas imagens em menor aumento as CGM (seta fina) exibindo formatos e tamanhos variados dispersos no tecido conjuntivo (TC), contendo hemácias extravasadas (seta grossa) dos vasos; C-F) detalhe das várias formas das CGM, algumas com maior número de núcleos (seta fina) e outras com menor número de núcleos (seta verde). Notar, no tecido conjuntivo (TC), inúmeras células “fibroblasto-like” (seta azul), imagens de mitose (seta vazada) e pequenas áreas de extravasamento de hemácias (seta grossa). HE, objetiva de 40X e 100X.

Tabela 4: Densidade de volume e número de células gigantes multinucleadas em ambos os grupos.

Parâmetro	Grupo 1 (agressivo) (n=10)	Grupo 2 (não agressivo) (n=15)	Valor de “t”	Valor de “p”
Densidade de volume (%)	12,10 ± 7,088	7,09 ± 2,072	2,687	0,013*
Número de CGM por mm²	73,31 ± 37,57	57,68 ± 27,693	1,192	0,245

Teste t de Student

* Estatisticamente significativa (p≤0,05)

Os aspectos histopatológicos das LCCG são bem conhecidos, no entanto, o significado dos achados ainda não foi claramente definido. Nos últimos anos, os patologistas concentraram-se em identificar parâmetros histopatológicos que permitam prognosticar a doença com mais precisão. Esforços foram concentrados nas diferenças histológicas e citométricas ou, ainda, na evidenciação do perfil imuno-histoquímico e na quantificação de DNA nas células gigantes. Nenhum desses estudos, entretanto, conseguiu estabelecer parâmetros para prever o curso clínico da doença (CHUONG *et al.*, 1986; FICARRA, KABAN, HANSEN, 1987; ECKARDT *et al.*, 1989; O'MALLEY *et al.*, 1997). Segundo Chuong *et al.* (1986), não há diferenças histológicas entre os tipos agressivos e não agressivos, mas para Eckardt *et al.* (1989), apesar de achados histológicos muito similares, as lesões agressivas apresentam células gigantes maiores, o que também pôde ser observado no presente estudo (tabela 4). Segundo Regezi (2004), as LCCG mais agressivas têm populações mais densas de células gigantes uni ou multinucleares e um tecido fibrovascular menos denso. A maioria dos estudos focaliza as células gigantes, numa tentativa de entender o seu verdadeiro significado biológico (ECKARDT *et al.*, 1989; TIFTEE; AUFDEMORTE, 1997). No presente estudo, não houve uma relação positiva entre a agressividade da lesão e o número de células gigantes na análise morfométrica (tabela 4), sendo que não houve diferença estatisticamente significativa no número de células gigantes entre as lesões do grupo 1 e do grupo 2. Com relação à densidade de volume, essa diferença pôde ser constatada estatisticamente (tabela 4), o que está em acordo com os estudos publicados por Ficarra, Kaban e Hansen (1987) e Krüse-Lösler *et al.* (2006). Tiffee e Aufdemorte

(1997) também afirmam que LCCG mais agressivas têm populações mais densas de células gigantes uninucleares ou multinucleares.

Krüse-Lösler *et al.* (2006) mostraram, através de análise morfométrica, que as lesões agressivas apresentaram um maior número de células gigantes em relação às não agressivas, diferença não constatada estatisticamente no presente estudo. Isso nos leva a crer que, embora, em número, as lesões agressivas possam não apresentar mais células gigantes que as não agressivas, as primeiras, de uma forma geral, tendem a apresentar lesões com células gigantes maiores, justificando essa diferença na densidade de volume (tabela 4).

Embora alguns autores acreditem na natureza osteoclástica das células gigantes nas LCCG (POGREL, 2003), de acordo com Vered, Buchner e Dayan (2006), atualmente existe um consenso de que tais células possuem características intermediárias das linhagens macrofágica/osteoclástica e macrofágica/monocítica. Isto foi detectado pela marcação positiva tanto para receptores de calcitonina - linhagem macrofágica/osteoclástica - como para receptores de glicocorticóides - linhagem macrofágica/monocítica).

Como os exames histopatológicos são pouco específicos e não são parâmetros fiéis para se estabelecer prognóstico (AUCLAIR *et al.*, 1988; ECKARDT *et al.* 1989; KRÜSE-LÖSLER *et al.*, 2006), analisar o comportamento clínico da doença é de suma importância (CHUONG *et al.*, 1986; KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1991). Microscopicamente, outras afecções podem apresentar características indistinguíveis das LCCG, como cisto ósseo aneurismático, tumor marrom do hiperparatireoidismo, tumor de células gigantes e querubismo (DE LANGE; VAN DEN AKKER, 2005). Daí a necessidade de exames complementares e, sobretudo, do conhecimento dos aspectos clínicos dessas lesões para fechar o diagnóstico e escolher o melhor tipo de tratamento. Aliás, foi com base nos aspectos clínicos que Chuong *et al.* (1986) dividiram as LCCG em agressivas e não agressivas. Tal divisão de comportamento biológico é determinante para o plano de tratamento.

Cabe-nos ainda, de forma singular, mencionar a importância da tomografia computadorizada, a qual pode fornecer dados detalhados para a avaliação da

LCCG, como a verdadeira extensão da lesão e destruição de tecido ósseo, perfuração das corticais e envolvimento de estruturas nobres. Tais dados são importantes para avaliar a agressividade da doença. Em virtude do alto custo desse exame complementar, não foi possível realizá-lo em todos os pacientes. Nos casos examinados (nove), o método ofereceu mais detalhes sobre a extensão real da lesão, e sua relação com estruturas adjacentes. Para Chuong *et al.* (1986), a tomografia provê informações importantes para o tratamento como, por exemplo, as perfurações corticais que influenciam a recidiva do processo.

Para estabelecer a modalidade de tratamento, o ideal seria aplicar marcadores moleculares, biológicos ou genéticos, capazes de estabelecer o grau de agressividade da afecção. Entretanto, esses parâmetros não estão bem definidos, sendo os critérios de Chuong *et al.* (1986) o que se utiliza até o momento.

Para Kaban *et al.* (2002) e Pogrel (2003) os fatores que devem ser levados em conta para a escolha do tratamento são: comportamento agressivo versus não agressivo, localização, tamanho da lesão e aparência radiográfica.

Embora a cirurgia seja o tratamento de eleição, pela literatura (BATAINEH; AL-KHATEEB; RAWASHDEH, 2002), essa opção de tratamento não parece ser a ideal, pois pode gerar mutilações e alta morbidade, principalmente em crianças e pacientes jovens.

Cabe, nessa discussão, breve comentário sobre o aspecto “reparador” antes usado na denominação das LCCG. Tal aspecto foi defendido por Jaffe, em 1953, que acreditava na reatividade e autolimitação do desenvolvimento da afecção. Vários autores, entre eles, Chuong *et al.* (1986), Cohen e Hertzanu (1888) e Eisenbud *et al.* (1988) defendem a tese de que o termo “reparador” não se aplica porque há casos extremamente destrutivos. Waldron e Shafer (1966) condenaram o termo porque nunca houve cura espontânea, ao contrário, a agressividade de alguns casos fazia pensar em neoplasia (WHITAKER; WALDRON, 1993). Em 10 dos casos envolvidos neste trabalho, a agressividade era clara, o que nos faz descartar qualquer atividade reparadora.

Regezi (2004) admite o caráter reparador em alguns casos e neoplásico em outros, baseado na resposta ao tratamento. Percebe-se que não há consenso na

literatura.

Há uma neoplasia que ocorre em ossos longos, similar às LCCG. Trata-se do tumor de células gigantes (TCG). Para alguns, o TCG e a LCCG são lesões similares e, provavelmente, idênticas. Para esses autores, as lesões que acometem a face são encontradas mais precocemente, em virtude da dor e também pelo fato de que qualquer tumefação na face é mais facilmente percebida. Nos ossos longos a dor não é um sintoma tão frequente. (AUCLAIR *et al.*, 1988; WALDRON; SHAFER, 1966). Para outros autores (AUSTIN; DAHLIN; ROYER, 1959), a LCCG e o TCG são entidades distintas. Em função das diferenças de comportamento clínico e histológico, eles acreditam que o TCG raramente acomete os maxilares. Mesmo com vários autores defendendo as duas hipóteses, ainda não existem estudos conclusivos que possam apoiar uma ou outra, embora a LCCG agressiva apresente evolução e prognóstico melhores quando comparada ao TCG.

5.4 Estudo genético

Estudos visando a elucidar a real etiopatogenia das LCCG devem ser encorajados, para que protocolos de tratamento cada vez mais precisos possam ser determinados. Outra polêmica bastante recorrente é a semelhança entre o querubismo e a LCCG, principalmente dos achados histopatológicos. A similaridade faz especular que ambas as doenças podem ter um mesmo princípio genético. Como já está claro na literatura que o querubismo é causado por mutações no gene SH3BP2 (MANGION *et al.*, 1999; UEKI *et al.*, 2001; MIAH *et al.*, 2004; LIETMAN *et al.*, 2006), buscamos, no presente estudo, demonstrar possíveis mutações no gene SH3BP2 em pacientes portadores da LCCG. Os produtos da amplificação com os tamanhos esperados foram gerados para todas as amostras de DNA extraídas do sangue e dos tecidos em blocos de parafina. Todas as 25 amostras de sangue e de tecido mostraram-se livres de mutações com alterações celulares/fenotípicas nos treze exons estudados. Curiosamente, uma alteração foi encontrada no exon 4, em dez amostras de sangue e nas amostras de tecido correspondentes. Essa alteração (posição 300 T>C) implica na mudança de códon de CAT para CAC, o qual codifica o mesmo aminoácido histidina. Com apenas uma exceção, todos os pacientes se mostraram homozigotos tanto no “tipo selvagem” (número de acesso no GenBank:

NT 006051.18) como na alteração. (i.e. ambos apresentaram T ou C nesta posição).
Figura 6.

Figura 6- Cromatogramas parciais representativos do exon 4 do gene SH3BP2, mostrando a alteração na posição 300 (timina para citosina) em dez pacientes. Note, abaixo, a representação do único paciente que se mostrou heterozigoto nessa posição. n=número de pacientes

Lietman *et al.* (2007) analisaram 10 tumores de células gigantes e nove LCCG. Os autores não encontraram nenhuma mutação no exon 9 do gene SH3BP2 e, além disso, mostraram que a transcrição e tradução de SH3BP2 se mostravam abundantes nas lesões. Em apenas um caso, entretanto, eles encontraram uma transcrição incompleta do SH3BP2, não totalmente explicada, que também levava à produção de uma proteína truncada. O estudo conclui que uma mutação de deleção no SH3BP2, fora do exon 9, deveria existir. Ueki *et al.* (2007) sugeriram que o gene SH3BP2 estava envolvido na regulação da atividade de osteoblastos e osteoclastos. Como consequência, mutações nesse gene podiam levar a uma disfunção, interferindo na via regulatória da osteoclastogênese, ou seja, através de ativação patológica dos osteoclastos (HYCKEL *et al.*, 2005; IDOWU *et al.*, 2008), o que, também, justifica a suposição do envolvimento do referido gene nas LCCG.

De Lange *et al.* (2007) e Idowu *et al.* (2008) analisaram respectivamente quatro e 15 pacientes e não encontraram qualquer mutação no exon 9.

Em 2003, uma mutação no exon 9 do gene SH3BP2 foi descrita em um caso de querubismo não-familiar (IMAI *et al.*, 2003) e, mais recentemente, uma mutação no exon 3, em um caso esporádico de querubismo agressivo (CARVALHO *et al.*, 2008), assim como uma mutação no exon 4 (CARVALHO *et al.*, 2009). Analisando material proveniente da lesão (refrigerado a -80°C) de quatro pacientes portadores de LCCG na mandíbula, o mesmo grupo encontrou uma mutação somática no exon 11, em um paciente (CARVALHO *et al.*, 2009). Como esse paciente apresentava uma pequena lesão radiolúcida, unilocular e não agressiva, essa mutação poderia estar relacionada a um fenótipo específico. Entretanto, os dados até aqui obtidos foram insuficientes para se estabelecer conclusões definitivas, razão pela qual realizamos o presente estudo com maior casuística e envolvendo todos os treze exons que compõem o gene SH3BP2. O estudo inclui 25 pacientes com diferentes fenótipos, mesclando lesões agressivas e não agressivas com diferentes localizações e imagens radiográficas. Incluiu 15 pacientes com lesões de caráter não agressivo, com fenótipos semelhantes àquele que apresentou a mutação no exon 11, descrita por Carvalho *et al.* (2009). Entretanto, a ausência da mesma mutação nos nossos pacientes (tecido e sangue) indica que uma estreita relação entre a mutação e o fenótipo não parece existir. Assim, permanece incerto se a

mutação espontânea descrita por Carvalho *et al.*, (2009) no tecido poderia realmente ser responsável pelo desenvolvimento da LCCG.

Em nossa casuística, foi ainda encontrada uma alteração em um códon no exon 4, no sangue e no tecido de dez pacientes. Curiosamente, essa alteração (assim como a versão alelo não polimórfica) foi idêntica para ambos os alelos (homozigoto) em todos os pacientes, com exceção de um. Entretanto, a alteração observada resulta em uma sequência que mantém a transcrição do aminoácido histidina (mutação silenciosa). Portanto, podemos sugerir que os achados genéticos potencialmente não trazem consequências fenotípicas aos indivíduos afetados.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

- Não foi encontrada relação entre o número de células gigantes e a agressividade da LCCG.
 - Nas LCCG agressivas, as CGM são maiores que nas lesões não agressivas.
 - Nenhuma mutação que resultasse em alteração da transcrição foi encontrada no gene SH3BP2 em pacientes portadores de LCCG.
 - A mutação silenciosa encontrada no códon do exon 4 de dez portadores de LCCG merece novas investigações.
 - A similaridade fenotípica entre o querubismo e as LCCG não é dependente do gene SH3BP2.
-
-

Referências

REFERÊNCIAS

Abdo EN, Alves LC, Rodrigues AS, Mesquita RA, Gomez RS. Treatment of a central giant cell granuloma with intralesional corticosteroid. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2005;43(1):74-6.

Abrams B, Shear M. A histological comparison of the giant cells in the central giant cell granuloma of the jaws and the giant cell tumor of long bone. *J Oral Pathol.* 1974;3(5):217-23.

Abu-El-Naaj I, Ardekian L, Liberman R, Peled M. Central giant cell granuloma of the mandibular condyle: a rare presentation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60(8):939-41.

Adornato MC, Paticoff KA. Intralesional corticosteroid injection for treatment of central giant-cell granuloma. *J Am Dent Assoc.* 2001;32(2):186-90.

Amaral FR, Brito JA, Perdigão PF, Carvalho VM, de Souza PE, Gomez MV, De Marco L, Gomez RS. NFATc1 and TNF α expression in giant cell granuloma of the jaws. *J Oral Pathol Med.* 2010 Mar;39(3):269-74.

Andersen L, Fejerskov O, Philipsen HP. Oral giant cell granulomas. A clinical and histological study of 129 new cases. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1973;81(5):606-16.

Arnott DG. Cherubism--an initial unilateral presentation. *Br J Oral Surg.* 1978;16(1):38-46

Auclair PL, Cuenin P, Kratochvil FJ, Slater LJ, Ellis GL. A clinical and histomorphologic comparison of the central giant cell granuloma and the giant cell tumor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988;66(2):197-208.

Austin Jr LT, Dahlin DC, Royer RQ. Giant-cell reparative granuloma and related conditions affecting the jawbones. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1959; 12:1285-95.

Barnes L, Eveson JW, Reichart PA, Sidransky D. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of the head and neck. 2005. Lyon: IARC.

Bataineh AB, Al-Khateeb T, Rawashdeh MA. The surgical treatment of central giant cell granuloma of the mandible. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002;60(7):756-61.

Beaman FD, Bancroft LW, Peterson JJ, Kransdorf MJ, Murphey MD, Menke DM. Imaging characteristics of cherubism. *AJR Am J Roentgenol*. 2004 Apr;182(4):1051-4.

Bell SM, Shaw M, Jou YS, Myers RM, Knowles MA. Identification and characterization of the human homologue of SH3BP2, an SH3 binding domain protein within a common region of deletion at 4p16.3 involved in bladder cancer. *Genomics*. 1997;44:163-70

Carlos R, Sedano HO. Intralesional corticosteroids as an alternative treatment for central giant cell granuloma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;93(2):161-6.

Carvalho VM, Perdigao PF, Pimenta FJ, de Souza PE, Gomez RS, De Marco L. A novel mutation of the SH3BP2 gene in an aggressive case of cherubism. *Oral Oncol*. 2008;44:153-5.

Carvalho VM, Perdigao PF, Amaral FR, de Souza PE, De Marco L, Gomez, RS. Novel mutations in the SH3BP2 gene associated with sporadic central giant cell lesions and cherubism. *Oral Dis*. 2009;15:106-10.

Chuong R, Kaban LB, Kozakewich H, Perez-Atayde A. Central giant cell lesions of the jaws: a clinicopathologic study. *J Oral Maxillofac Surg*. 1986; 44:708-13.

Cohen MM Jr, Hyden PW. A newly recognized hamartomatous syndrome. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1979;15:291-6.

Cohen MA, Hertzanu Y. Radiologic features, including those seen with computed tomography, of central giant cell granuloma of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988; 65(2): 255-61.

Cohen MM Jr, Proteus syndrome: an update. *Am J Med Genet C. Semin Med Genet.* 2005;137:38-52.

Cooper A, Travers B. Surgical essays: Giant Cell Tumors of the mandible and maxilla. *Oral Surg.* 1818;14:809-27.

de Lange J, Rosenberg AJ, van den Akker HP, Koole R, Wirds JJ, van den Berg H. Treatment of central giant cell granuloma of the jaw with calcitonin. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1999;28(5):372-6.

de Lange J, Van Den Akker HP, 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.* 2004;26(9):792-5.

de Lange J, Van Den Akker HP. Clinical and radiological features of central giant-cell lesions of the jaw. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;99(4):464-70.

de Lange J, van Maarle MC, van den Akker HP, Redeker EJ. DNA analysis of the SH3BP2 gene in patients with aggressive central giant cell granuloma. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2007;45:499-500.

de Lange J, van Maarle MC, van den Akker HP, Redeker EJW. A new mutation in the SH3BP2 gene showing reduced penetrance in a family affected with cherubism. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103:378-81.

de Souza PE, Paim JF, Carvalhais JN, Gomez RS. Immunohistochemical expression of p53, MDM2, Ki-67 and PCNA in central giant cell granuloma and giant cell tumor. *J Oral Pathol Med.* 1999;28(2):54-8.

Eckardt A, Pogrel MA, Kaban LB, Chew K, Mayall BH. Central giant cell granulomas of the jaws: nuclear DNA analysis using image cytometry. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1989;18:3-6.

Eisenbud L, Stern M, Rothberg M, Sachs SA. Central giant cell granuloma of the jaws: experiences in the management of thirty-seven cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 1988;46(5):376-84.

Ficarra G, Kaban LB, Hansen LS. Central giant cell lesions of the mandible and maxilla: a clinicopathologic and cytometric study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987;64(1):44-9.

Flanagan AM, Nui B, Tinkler SM, Horton MA, Williams DM, Chambers TJ. The multinucleate cells in giant cell granulomas of the jaw are osteoclasts. *Cancer.* 1988;62:1139-45.

Franch G, Barra MB, Hauth L, Arrarte JL, Carli A, Peduzzi F. Granuloma de células gigantes de seio maxilar: relato de um caso. *Rev Bras de Otorrinolaringol.* 1999;65(2):167-70.

Güngörmüş M.; Akgül HM. Central Giant cell Granuloma of the jaws: A clinical and Radiologic Study. *J Contemp Dent Pract.* 2003;4(3):87-97.

Harris M. Central giant cell granulomas of the jaws regress with calcitonin therapy. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1994;31(2):89-94.

Hitomi G, Nishide N, Mitsui K. Cherubism: diagnostic imaging and review of the literature in Japan. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996 May;81(5):623-8.

Horner K. Central giant cell granuloma of the jaws: a clinico-radiological study. *Clin Radiol.* 1989;40(6):622-6.

Hyckel P, Berndt A, Schleier P, Clement JH, Beensen V, Peters H, Kosmehl H. Cherubism - new hypotheses on pathogenesis and therapeutic consequences. *J Craniomaxillofac Surg.* 2005;33:61-8.

Idowu BD, Thomas G, Frow R, Diss TC, Flanagan AM. Mutations in SH3BP2, the cherubism gene, were not detected in central or peripheral giant cell tumours of the jaw. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2008;46:229-30.

Imai Y, Kanno K, Moriya T, Kayano S, Seino H, Matsubara Y, Yamada A. A missense mutation in the SH3BP2 gene on chromosome 4p16.3 found in a case of nonfamilial cherubism. *Cleft Palate Craniofac J.* 2003;40:632-8.

Itonaga I, Hussein I, Kudo O, Sabokbar A, Watt-Smith S, Ferguson D, Athanasou NA. Cellular mechanisms of osteoclast formation and lacunar resorption in giant cell granuloma of the jaw. *J Oral Pathol Med.* 2003;32(4):224-31.

Jacoway Jr, Howell FV, Terry BC. Central giant cell granuloma: an alternative to surgical therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988;66:572.

Jaffe HL. Giant-cell reparative granuloma, traumatic bone cyst, and fibrous (fibro-oseous) dysplasia of the jawbones. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1953;6(1):159-75.

Jones WA. Familial multilocular cystic disease of the jaws. *Am. J. Cancer.* 1933;17:946-50.

Jones AC, McGuff HS. Oral and maxillofacial pathology. Case of the month: cherubism. *Tex Dent J.* 2009 Mar;126(3):268-9.

Kaban LB, Mulliken JB, Ezekowitz RA, Ebb D, Smith PS, Folkman J. Antiangiogenic therapy of a recurrent giant cell tumor of the mandible with interferon alfa-2a. *Pediatrics*. 1999;103(6):1145-9.

Kaban LB, Troulis MJ, Ebb D, August M, Hornicek FJ, Dodson TB. Antiangiogenic therapy with interferon alpha for giant cell lesions of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002;60(10):1103-11.

Kaban LB, Guralnick WC, Dodson TB. Calcitonin Therapy for Central Giant Cell Granuloma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61:653-4.

Kaffe I, Ardekian L, Taicher S, Littner MM, Buchner A. Radiologic features of central giant cell granuloma of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996;81(6):720-6.

Kaugars GE, Niamtu J 3rd, Svirsky JA. Cherubism: diagnosis, treatment, and comparison with central giant cell granulomas and giant cell tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992;73(3):369-74.

Kerley TR, Schow CE Jr. Central giant cell granuloma or cherubism. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1981 Feb;51(2):128-30.

Kermer C, Millesi W, Watzke IM. Local injection of corticosteroids for central giant cell granuloma. A case report. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1994;2:366-8.

Kozakiewicz M, Perczynska-Partyka W, Kobos J. Cherubism--clinical picture and treatment. *Oral Dis*. 2001 Mar;7(2):123-30.

Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. Histological typing of odontogenic tumours. 1991; 2ed. Germany: Springer-Verlag.

Krüse-Lösler B, Diallo R, Gaertner C, Mischke KL, Joos U, Kleinheinz J. Central giant cell granuloma of the jaws: a clinical, radiologic, and histopathologic study of 26 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101(3):346-54.

Kurtz M, Mesa M, Alberto P. Treatment of a central giant cell lesion of the mandible with intralesional glucocorticosteroids. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91(6):636-7

Lee JY, Jung YS, Kim SA, Lee SH, Ahn SG, Yoon JH. Investigation of the SH3BP2 gene mutation in cherubism. *Acta Med Okayama*. 2008 Jun;62(3):209-12.

Li C, Yu S. A novel mutation in the SH3BP2 gene causes cherubism: case report. *BMC Medical Genetics* 2006;7:84.

Lietman SA, Kalinchinko N, Deng X, Kohanski R, Levine MA. Identification of a novel mutation of SH3BP2 in cherubism and demonstration that SH3BP2 mutations lead to increased NFAT activation. *Hum Mutat*. 2006;27:717-8.

Lietman SA, Prescott NL, Hicks DG, Westra WH, Levine MA. SH3BP2 is rarely mutated in exon 9 in giant cell lesions outside cherubism. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;459:22-7.

Lietman SA, Yin L, Levine MA. SH3BP2 is an activator of NFAT activity and osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;371:644-8.

Liu B, Yu SF, Li TJ. Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts. *J Oral Pathol Med*. 2003;32(6):367-75.

Lo B, Faiyaz-Ul-Haque M, Kennedy S, Aviv R, Tsui LC, Teebi AS. Novel mutation in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 causes cherubism. *Am J Med Genet A*. 2003;121A:37-40.

Mangion J, Rahman N, Edkins S, Barfoot R, Nguyen T, Sigurdsson A, Townsend JV, Fitzpatrick DR, Flanagan AM, Stratton MR. The gene for cherubism maps to chromosome 4p16.3. *Am J Hum Genet.* 1999;65:151-7.

Marck PA, Kudryk WH. Cherubism. *J Otolaryngol.* 1992;21(2):84-7.

Meng XM, Yu SF, Yu GY. Clinicopathologic study of 24 cases of cherubism. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005;34(4):350-6

Miah SM, Hatani T, Qu X, Yamamura H, Sada K. Point mutations of 3BP2 identified in human-inherited disease cherubism result in the loss of function. *Genes Cells.* 2004;9:993-1004.

Minic A, Stajcic Z. Prognostic significance of cortical perforation in the recurrence of central giant cell granulomas of the jaws. *J Craniomaxillofac Surg.* 1996;24(2):104-8.

Nogueira RLM, Teixeira RC, Lima MC, Sant'ana E, Santos CF. Apnoea–hypopnoea and mandibular retrusion as uncommon findings associated with Proteus syndrome. *Dentomaxillofacial Radiology.* 2007;36:367–71.

Nogueira RLM, Teixeira RC, Cavalcante RB, Ribeiro RA, Rabenhosrt SHB. Intralesional injection of triamcinolone hexacetonide as an alternative treatment for central giant cell granuloma in 21 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010 Dec;39(12):1204-10.

O'Malley M, Pogrel MA, Stewart JC, Silva RG, Regezi JA. Central giant cell granulomas of the jaws: phenotype and proliferation-associated markers. *J Oral Pathol Med.* 1997;26(4):159-63.

O'Regan EM, Gibb DH, Odell EW. Rapid growth of giant cell granuloma in pregnancy treated with calcitonin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92(5):532-8.

Penfold CN, McCullagh P, Eveson JW, Ramsay A. Giant cell lesions complicating fibro-osseous conditions of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1993;22(3):158-62.

Peters WJ. Cherubism: a study of twenty cases from one family. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1979;47:307-11.

Pogrel MA, Regezi JA, Harris ST, Goldring SR. Calcitonin treatment for central giant cell granulomas of the mandible: report of two cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 1999;57(7):848-53.

Pogrel MA. Calcitonin therapy for central giant cell granuloma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61(6):649-53.

Rajeevan NS, Soumithran CS. Intralesional corticosteroid injection for central giant cell granuloma. A case report. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1998;27(4):303-4.

Rawashdeh MA, Bataineh AB, Al-Khateeb T. Long-term clinical and radiological outcomes of surgical management of central giant cell granuloma of the maxilla. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35(1):60-6.

Regezi JA. Comments on the pathogenesis and medical treatment of central giant cell granuloma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;61:116-8.

Riefkohl R, Georgiade GS, Georgiade NG. Cherubism. *Ann Plast Surg.* 1985;14:85-90.

Rosemberg AE, Nielsen GP. Giant Cell containing lesions of bone and their differential diagnosis. *Current Diagnostic Pathology.* 2001;87: 235-46.

Ruggieri M, Pavone V, Polizzi A, Albanese S, Magro G, Merino M, Duray PH. Unusual form recurrent giant cell granuloma of the mandible and lower extremities in a patient with neurofibromatosis type 1. *Oral Surg Oral med Oral Pathol.* 1999;87(1):67-72.

- Schultze-Mosgau S, Holbach LM, Wiltfang J. Cherubism: clinical evidence and therapy. *J Craniofac Surg*. 2003 Mar;14(2):201-8.
- Sidhu MS, Parkash H, Sidhu SS. Central giant cell granuloma of jaws--review of 19 cases. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1995;33(1):43-6.
- Silva EC, de Souza PE, Barreto DC, Dias RP, Gomez RS. An extreme case of cherubism. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2002 Feb;40(1):45-8.
- Silva GC, Gomez RS, Vieira TC, Silva EC. Cherubism: long-term follow-up of 2 patients in whom it regressed without treatment. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Oct;45(7):567-70.
- Singh-Wissmann K, Ferry JG. Transcriptional regulation of the phosphotransacetylase-encoding and acetate kinase-encoding genes (pta and ack) from *Methanosarcina thermophila*. *J Bacteriol*. 1995;177:1699-702.
- Southgate J, Sarma U, Townend JV, Barron J, Flanagan AM. Study of the cell biology and biochemistry of cherubism. *J Clin Pathol*. 1998 Nov;51(11):831-7.
- Stavropoulos F, Katz J. Central giant cell granulomas: a systematic review of the radiographic characteristics with the addition of 20 new cases. *Dentomaxillofacial Radiology*. 2002;31:213-7.
- Terry BC, Jacoway JR. Management of central giant cell lesions: an alternative to surgical therapy. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 1994;6: 579-600.
- Tiffée JC, Aufdemorte TB. Markers for macrophages and osteoclast lineages in giant cell lesions of oral cavity. *J oral Maxillofac Surg*. 1997;55:1112-3.
- Timoșca GC, Găleşanu RM, Cotuțiu C, Grigoraș M. Aggressive form of cherubism: report of a case. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000 Mar;58(3):336-44.
-

Tiziani V, Reichenberger E, Buzzo CL, Niazi S, Fukai N, Stiller M, Peters H, Salzano FM, Raposo do Amaral CM, Olsen BR. The gene for cherubism maps to chromosome 4p16. *Am J Hum Genet.* 1999 Jul;65(1):158-66.

Tosco P, Tanteri G, Iaquina C, Fasolis M, Rocchia F, Berrone S, Garzino-Demo P. Surgical treatment and reconstruction for central giant cell granuloma of the jaws: a review of 18 cases. *J Craniomaxillofac Surg.* 2009; 37(7):380-7

Ueki Y, Tiziani V, Santanna C, Fukai N, Maulik C, Garfinkle J, Ninomiya C, doAmaral C, Peters H, Habal M, Rhee-Morris L, Doss JB, Kreiborg S, Olsen BR, Reichenberger E. Mutations in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 cause cherubism. *Nat Genet.* 2001;28:125-26.

Ueki Y, Lin CY, Senoo M, Ebihara T, Agata N, Onji M, Saheki Y, Kawai T, Mukherjee PM, Reichenberger E, Olsen BR. Increased myeloid cell responses to M-CSF and RANKL cause bone loss and inflammation in SH3BP2 "cherubism" mice. *Cell.* 2007;128:71-83.

Valiathan A, Prashanth VK. Cherubism: presentation of a case. *Angle Orthod.* 1997;67(3):237-8.

Van Damme PA, Mooren RE. Differentiation of multiple giant cell lesions, Noonan-like syndrome and (occult) hyperparathyroidism. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1994;23(1):32-6.

Vered M, Buchner A, Dayan D. Immunohistochemical expression of glucocorticoid and calcitonin receptors as a tool for selecting therapeutic approach in central giant cell granuloma of the jawbones. *J Oral Maxillofacial Surgery.* 2006;35:756-60.

Vered M, Nasrallah W, Buchner A, Dayan D. Stromal myofibroblasts in central giant cell granuloma of the jaws cannot distinguish between non-aggressive and aggressive lesions. *J Oral Pathol Med.* 2007;36(8):495-500.

Waldron CA, Shafer WG. The central giant cell reparative granuloma of the jaws. An analysis of 38 cases. *Am J Clin Pathol.* 1966;45(4):437-47.

Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol.* 1969;26:235-302.

Whitaker SB, Waldron CA. Central giant cell lesions of the jaws. A clinical, radiologic, and histopathologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993;75(2):199-208.

Whitaker SB, Bouquot JE. Estrogen and progesterone receptor status of central giant cell lesions of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;77(6):641-4.

Yamaguchi T, Dorfman HD, Eisig S. Cherubism: clinicopathologic features. *Skeletal Radiol.* 1999 Jun;28(6):350-3.

Zachariades N, Papanicolaou S, Xypolyta A, Constantinidis I. Cherubism. *Int J Oral Surg.* 1985;14(2):138-45.

Zohar Y, Grausbord R, Shabtai F, Talmi Y. Fibrous dysplasia and cherubism as an hereditary familial disease. Follow-up of four generations. *J Craniomaxillofac Surg.* 1989; 17(8):340-4.