

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Odontologia

Marcella Rezende Serpa Zanini

**EXPRESSÃO DOS RECEPTORES CCR1 E CCR2 NAS LESÕES DE CÉLULAS
GIGANTES BUCAIS**

Belo Horizonte
2012

Marcella Rezende Serpa Zanini

**EXPRESSÃO DOS RECEPTORES CCR1 E CCR2 NAS LESÕES DE CÉLULAS
GIGANTES BUCAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – Mestrado da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Clínicas Odontológicas – Ênfase: Estomatologia.

Orientador: Paulo Eduardo Alencar de Souza

Belo Horizonte
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Z31E

Zanini, Marcella Rezende Serpa

Expressão dos receptores CCR1 e CCR2 nas lesões de células gigantes
bucais / Marcella Rezende Serpa Zanini. Belo Horizonte, 2012.

45f.: il.

Orientador: Paulo Eduardo Alencar de Souza

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Granuloma de células gigantes. 2. Receptores de quimiocinas. 3.
Osteoprotegerina. I. Souza, Paulo Eduardo Alencar de. II. Pontifícia Universidade
Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III.
Título.

SIB PUC MINAS

CDU: 616.314-089.23

FOLHA DE APROVAÇÃO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho:

À doutora *Daniela Rodrigues de Faria* pela colaboração valiosa na execução dos experimentos e na aquisição das imagens.

Ao professor *Martinho Campolina Rebello Horta* pelo auxílio nas análises estatísticas e pelo exemplo de professor.

Aos pacientes que se dispuseram a participar desta pesquisa.

Aos professores da disciplina de Estomatologia: *Carlos Martins, Helenice Marigo, Rosana Leal, Herminia Capistrano*, que estiveram conosco no dia a dia e estavam sempre dispostos a ensinar.

Em especial, agradeço ao meu orientador *Paulo Eduardo Alencar de Souza* por todo o seu empenho, pelas valiosas contribuições e correções aportadas a esse trabalho, dedicação ao ensino e principalmente por tornar este momento possível.

Muito aprendi com todos, e vocês fizeram estes anos valer a pena.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro, ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG (CEMEL-ICB) pela utilização dos microscópios e equipamentos.

Agradeço a Deus por me dar a perseverança necessária para concluir mais esta etapa em minha carreira.

Ao meu marido, *Thiago Zanini*, pelo apoio e incentivo oferecido, meu exemplo de pessoa e de profissional.

À minha família, que sempre incentivou o meu crescimento profissional.

RESUMO

As lesões central de células gigantes (LCCG) e as lesões periféricas de células gigantes (LPCG) são constituídas por células gigantes osteoclásticas e células mononucleares com características fenotípicas e funcionais de macrófagos, de precursores de osteoclastos e de células osteoblásticas. Recentemente, foi demonstrada expressão da interleucina-10, seu receptor (IL-10R) e do receptor de quimiocinas CCR5, sugerindo que mecanismos imunológicos mediados por citocinas e quimiocinas podem participar dos processos relacionados à patogênese dessas lesões. Como a ativação dos receptores de quimiocina CCR1 e CCR2 estimula o recrutamento e a diferenciação de precursores de osteoclasto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de CCR1 e CCR2 na LCCG e na LPCG. Para isso, 9 amostras frescas de LCCG e 10 de LPCG foram obtidos a partir de biópsias. As amostras congeladas foram cortadas e submetidas a reações de imunofluorescência, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CCR1 e anti-CCR2 e anticorpo secundário conjugado a fluorocromo. Análises microscópicas foram realizadas e a percentagem de células positivas para cada parâmetro, bem como a intensidade de fluorescência, foi determinada. Nossos resultados mostraram altas frequências de células CCR1+ e variada frequência de células CCR2+ nas populações de células gigantes e mononucleares em ambas as lesões. Houve correlação positiva entre as frequências de células mononucleares imunomarcadas para CCR1 e CCR2 na LPCG. Tanto as células gigantes, quanto as células mononucleares da LPCG, exibiram maiores frequências de expressão de CCR1 do que de CCR2. A detecção de elevadas frequências de células mononucleares e gigantes expressando CCR1 e CCR2 sugere a participação desses receptores de quimiocina nos processos relacionados ao desenvolvimento das lesões. Investigações sobre a produção de citocinas e quimiocinas ligantes de CCR1 e CCR2 nas lesões de células gigantes poderão esclarecer melhor a imunopatologia da LCCG e da LPCG.

Palavras-chave: Lesão central de células gigantes. Lesão periférica de células gigantes. Receptores de quimiocinas. Osteoclastogênese.

ABSTRACT

Central giant cell lesions (CGCL) and peripheral giant cell lesions (PGCL) are constituted by multinucleated (osteoclastic-like) giant cells in a background of mononuclear cells expressing functional and phenotypic characteristics of macrophages, osteoclast precursors and osteoblastic cells. Recently, it has been demonstrated the expression of interleukin-10, its receptor (IL-10R) and chemokine receptor CCR5, which suggests that immunological mechanism mediated by cytokines and chemokines should participate in pathogenic process of those lesions. Insofar as the activation of chemokine receptors CCR1 and CCR2 stimulate osteoclast precursors recruitment and differentiation, the purpose of this study was to evaluate both CCR1 and CCR2 expression in CGCL and PGCL. Thus, 9 CGCL sampler and 10 PGCL were obtained from surgical excision. Frozen specimens were cut and subjected to immunofluorescence staining using anti-CCR1 and anti-CCR2 monoclonal antibodies and fluorochrome-labelled secondary antibody. Microscopic analyses were performed and the percentage of positive mononuclear and giant cells for each parameter was obtained, besides their fluorescence intensity. The results show high frequency of CCR1+ cells and variated frequency of CCR2+ cells in giant and mononuclear cell populations in both lesions. There was positive correlation between frequencies of CCR1 and CCR2 immunomarked mononuclear cells on PGCL. Both giant and mononuclear cells on PGCL showed higher frequencies of CCR1 expression than CCR2. High frequencies of giant and mononuclear cells expressing CCR1 and CCR2 suggest the participation of those chemokine receptors in lesion's development. Further investigations about the production of cytokines and chemokine and CCR1 and CCR2 chemokine ligands in giant cell lesions shall elucidate the immunopathology of CGCL and PGCL.

Keywords: Central giant cell lesions. Peripheral giant cell lesions. Chemokine receptors. Osteoclastogenesis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 ARTIGO	22
REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

A lesão central de células gigantes (LCCG) e a lesão periférica de células gigantes (LPCG) são lesões de patogênese ainda desconhecida classificadas como lesões proliferativas não neoplásicas.

A LCCG é uma lesão intra-óssea, que acomete duas vezes mais a mandíbula do que a maxila, ocorrendo geralmente antes dos trinta anos de idade e mais frequentemente em mulheres (WHITAKER; WALDRON, 1993; LANGE; AKKER, 2005). No entanto, sua etiologia, patogênese e tratamento ainda não estão totalmente definidos (TOBÓN-ARROYAVE et al., 2005). A LCCG apresenta comportamento clínico variado e prognóstico indeterminado, podendo apresentar padrão agressivo ou não agressivo. O padrão agressivo é representado por dor, crescimento rápido, reabsorção radicular, causando expansão e destruição da cortical óssea, além de tendência a recorrência após tratamento. A forma não agressiva apresenta-se assintomática, de crescimento lento, descoberta na maioria dos casos em exame radiográfico de rotina, sem reabsorção radicular e da cortical óssea, além de baixa tendência a recidiva (WHITAKER; WALDRON, 1993).

Os aspectos radiográficos da LCCG não são específicos para o diagnóstico, mostrando-se na maioria das vezes como áreas radiolúcidas multiloculares de margens bem ou mal delimitadas (WHITAKER; WALDRON, 1993).

Sua etiologia ainda é incerta, embora alguns autores acreditem que um trauma possa causar hemorragia intramedular nos ossos maxilares, com alteração no processo de remodelação óssea, ocasionando a formação da lesão (SIDHU; PARKASH; SIDHU, 1995; LEBAN et al., 1971). Outros sugerem tratar-se de uma lesão inflamatória com alguma alteração no processo de reparo dos tecidos (SHKLAR; MEYER, 1961).

O tratamento mais utilizado para as LCCG é a enucleação cirúrgica, associada ou não a ostectomia periférica. Em casos mais agressivos, o tratamento recomendado é a ressecção em bloco, uma abordagem que geralmente leva a uma séria mutilação facial e perda de dentes. Entretanto existem tratamentos alternativos para lesões extensas como a administração de interferon-alfa, calcitonina e as injeções intralesionais de corticoesteróides, objetivando a regressão das lesões (CARLOS; SEDANO, 2002).

A LPCG é uma lesão benigna relativamente frequente, que ocorre na gengiva

ou mucosa alveolar de áreas edêntulas. São lesões únicas, assintomáticas, geralmente de crescimento lento, com características reativas e hiperplásicas. Apresentam-se como um nódulo firme, brilhante, de base séssil ou pedunculada, de coloração vermelha ou vermelho-arroxeadada, com diâmetro inferior a dois centímetros na maioria dos casos. A LPCG pode surgir em qualquer idade, com uma incidência maior entre a quinta e sexta décadas de vida, sendo mais observada em mulheres (NEVILLE et al., 2009; CHAPARRO-AVENDAÑO; BERINI-AYTÉS; GAY-ESCODA, 2005).

Sua etiologia também não é totalmente conhecida e alguns autores acreditam que fatores traumáticos ou irritativos locais, como a extração dentária, restaurações e próteses mal adaptadas e acúmulo de placa e cálculo, podem predispor ao desenvolvimento das lesões (GIANSANTI; WALDRON, 1969; KATSIKERIS; KAKARANTZA-ANGELOPOULOU; ANGELOPOULOS, 1988). Assim, a LPCG poderia ser uma lesão de natureza inflamatória em resposta a uma irritação crônica sobre o tecido conjuntivo do periósteo, gengiva ou ligamento periodontal (BONETTI et al., 1990; CHAPARRO-AVENDAÑO; BERINI-AYTÉS; GAY-ESCODA, 2005).

Alterações radiográficas são raramente observadas e, quando presentes, revelam uma discreta reabsorção óssea em forma de taça (CARVALHO et al., 1995; NEVILLE et al., 2009; CHAPARRO-AVENDAÑO; BERINI-AYTÉS; GAY-ESCODA, 2005). O tratamento consiste de excisão cirúrgica e remoção dos fatores irritativos locais (KATSIKERIS; KAKARANTZA-ANGELOPOULOU; ANGELOPOULOS, 1988; NEVILLE et al., 2009).

Os aspectos histopatológicos da LCCG e da LPCG são idênticos e consistem de numerosas células mononucleares de morfologia variando entre fusiforme e ovóide, permeadas por células gigantes multinucleadas de formatos e tamanhos variados, além de numerosos vasos sanguíneos, muitos deles imaturos, e extensas áreas de hemorragia podendo conter depósitos de hemossiderina (WALDRON; SHAFER, 1966; GIANSANTI; WALDRON, 1969; DAYAN; BUCHNER; SPIRER, 1990; CHUONG et al., 1986; BHASKAR et al., 1971). Lim e Gibbins (1995) observaram através de microscopia eletrônica, a presença vários leucócitos, principalmente macrófagos e neutrófilos, associados às células endoteliais e em processo de migração através das junções celulares interendoteliais nos vasos da periferia da LCCG.

As células gigantes presentes nessas lesões apresentam características

fenotípicas e funcionais de osteoclastos como expressão de fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP), receptores de calcitonina e vitronectina (VNR), catepsina K, metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9), anidrase carbônica II, CD68 e antígeno leucocitário comum (HLA), além da capacidade de reabsorver tecidos mineralizados *in vitro* (FLANAGAN et al., 1988; PAMMER et al., 1998; ITONAGA et al., 2003; LIU et al., 2003).

Em estudo realizado por Itonaga et al. (2003) foram identificadas três populações distintas entre as células mononucleares das lesões de células gigantes bucais. A maioria das células mononucleares apresentou características morfológicas e fenotípicas de macrófago, como a positividade para CD68, CD11a, CD11b, CD14 e HLA-DR. Uma minoria das células mononucleares dispersas na lesão apresentou características típicas de precursores de osteoclastos como positividade para receptor de vitronectina (VNR), CD68 e TRAP, sugerindo que estas células podem ser a fonte para formação das células gigantes tipo osteoclasto. Escassas células de morfologia fusiforme semelhantes a fibroblastos, expressando antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), também foram detectadas.

Liu et al. (2003) também caracterizaram as populações celulares na LCCG e na LPCG e observaram que cerca de 10 a 15% das células mononucleares exibiam fenótipo de precursores de osteoclastos, como positividade para TRAP, e encontravam-se próximas às células gigantes. Aproximadamente 30 a 40% das células mononucleares expressavam o antígeno de proliferação celular PCNA e exibiam morfologia fusiforme. Por meio de técnica de *hibridização in vitro*, eles verificaram que essas células fusiformes expressavam RNAm de osteoprotegerina (OPG) e de ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), os quais são produzidos por células osteoblásticas. As células gigantes multinucleadas e as células mononucleares de morfologia ovóide expressavam RNAm de RANK, marcador de osteoclastos de seus precursores, e OPG.

Os osteoblastos, osteoclastos e seus precursores comunicam-se através de mediadores químicos. As principais moléculas efetoras produzidas pelos pré-osteoblastos são: o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), a osteoprotegerina (OPG) e RANKL. O M-CSF estimula a proliferação e diferenciação de precursores de osteoclastos, os quais expressam RANK. O RANKL exerce as suas funções ao se ligar ao RANK na superfície dos pré-osteoclastos resultando na fusão, diferenciação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos. Já a OPG atua

como um inibidor solúvel na maturação e ativação dos osteoclastos, pois ao se ligar ao RANKL, inibe a interação RANK-RANKL. Além disso, OPG estimula a morte dos osteoclastos maduros por apoptose, exercendo uma forte atividade inibidora do processo de reabsorção óssea (ANDRADE et al., 2009; LANGE; AKKER; BERG, 2007).

A semelhança histológica da LCCG e da LPCG com as lesões do querubismo levou alguns pesquisadores a investigar se a presença de mutações no gene *SH3BP2*, presentes nos pacientes com querubismo, poderia ocorrer também nessas lesões. Esse gene ativa a isoforma c1 do fator nuclear de células T ativadas (NFATc1), um dos mais importantes fatores de transcrição indutores da osteoclastogênese, e estimula a produção do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (LIETMAN; YIN; LEVINE, 2008; NOVACK; FACCIO, 2007). Embora mutação no gene *SH3BP2* tenha sido observada apenas em um caso de quatro de LCCG (CARVALHO et al., 2009). Em outro estudo, o aumento da transcrição de NFATc1, principalmente nas células gigantes, e a diminuição da transcrição de TNF- α foram observados em todos os casos avaliados, sendo 05 de LCCG e 05 de LPCG, sugerindo envolvimento da via NFATc1 na formação das células gigantes multinucleadas e que outros fatores locais possam controlar a produção de citocinas nessas lesões (AMARAL et al., 2010).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que a maioria das células da LCCG e da LPCG expressa a interleucina-10 e seu receptor (IL-10R), sugerindo que mecanismos imunológicos mediados por citocinas podem participar dos processos relacionados à patogênese dessas lesões (SYRIO et al., 2011). Além disso, quase a totalidade das células mononucleares e todas as células gigantes de ambas as lesões expressam o receptor de quimiocina CCR5, reforçando a ideia de que os mediadores imunoinflamatórios podem ter papel importante no estabelecimento dessas lesões (SARAIVA, 2008).

Em sítios ósseos e inflamatórios, a comunicação celular através de mediadores solúveis e de moléculas expressas nas membranas celulares determina e controla a ocorrência dos processos biológicos envolvidos na destruição, reparo e remodelação tecidual. Nesse contexto, as quimiocinas desempenham papel importante no recrutamento leucocitário seletivo, angiogênese, osteoclastogênese, hematopoiese, doenças auto-imunes e crescimento tumoral (ROLLINS, 1997; MENTEN; WUYTS; DAMME, 2002). Atuam como mensageiros intercelulares e

exercem seus efeitos de forma autócrina ou parácrina (BAGGLIOLINI, 2001).

As quimiocinas compreendem uma família de citocinas quimiotáticas e se subdividem em dois grupos principais de acordo com a sequência de resíduos de cisteínas conservadas (MOROHASHI et al., 1995). As cisteínas formam duas pontes dissulfeto mantendo as regiões amino terminais juntas, sendo essencial para a sua atividade biológica (BAGGLIOLINI, 2001). Os membros do grupo CXC, como IL-8 e GRO-alfa, apresentam um aminoácido separando as cisteínas e são potentes fatores quimiotáticos e ativadores de neutrófilos (MOROHASHI et al., 1995). As quimiocinas do grupo CC, como CCL2, CCL3 e RANTES, são potentes fatores quimiotáticos e ativadores de monócitos e eosinófilos (MILLER; KRANGEL, 1992).

As quimiocinas são produzidas por diversos tipos de células teciduais, tais como células endoteliais, células epiteliais e fibroblastos. Citocinas pró-inflamatórias são os principais indutores da produção das quimiocinas (ABBAS; LICHTMAN, 2005). As quimiocinas de ambos os grupos se ligam aos proteoglicanos sulfato de heparan na superfície das células endoteliais vasculares e assim são exibidas aos leucócitos circulantes. A exibição celular proporciona uma alta concentração de quimiocinas que estimulam a motilidade dos leucócitos, os quais se ligam ao endotélio através de moléculas de adesão. Diferentes quimiocinas atuam sobre diferentes células e desse modo controlam a natureza do infiltrado inflamatório (MENTEN; WUYTS; DAMME, 2002).

Os receptores de quimiocinas são expressos na superfície dos leucócitos e o padrão de expressão dos receptores determina que tipos de células respondem a quais quimiocinas. A maioria dos receptores se liga a mais de uma quimiocina e uma mesma quimiocina pode ligar-se a mais de um receptor. A ligação das quimiocinas aos receptores é de alta afinidade, levando a ativação da proteína G que está acoplada à extremidade C-terminal do receptor, iniciando-se uma cascata de transdução de sinais (MURPHY et al., 2000). Os receptores de quimiocinas podem ser rapidamente regulados negativamente pela exposição a quimiocina, e este é o provável mecanismo de finalização das respostas (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Atualmente os receptores de quimiocinas são definidos pelo nome do grupo (CC, CXC) seguido pela letra "R" (receptor) e as quimiocinas, seus ligantes, seguido pela letra "L" (ligante) (MURPHY et al., 2000).

Os receptores CCR1 e CCR5 são expressos por monócitos e linfócitos T, estando envolvidos na inflamação e osteoclastogênese, sendo ativados pela ligação

das quimiocinas CCL3 (MIP-1alfa) e CCL5 (RANTES) (MENTEN; WUYTS; DAMME, 2002). A quimiocina CCL3 é um forte agente quimiotático para monócitos, estimulando a produção de metabólitos do ácido araquidônico e a exocitose por essas células (MENTEN; WUYTS; DAMME, 2002). Essa quimiocina também desempenha um papel importante na reabsorção óssea, promovendo a quimiotaxia de precursores de osteoclastos ao se ligar nos receptores CCR1 e CCR5 expressos nessas células (SCHEVEN, 1999; WATANABLE et al., 2004; OBA et al., 2005; LEE et al., 2007). Além disso, CCL3 atua no processo de diferenciação dos precursores dos osteoclastos induzido por RANKL, aumentando o número e o tamanho dos osteoclastos formados, estimulando a atividade dessas células e aumentando seu tempo de sobrevivência (OKAMATSU et al., 2004). Estudos demonstraram que os níveis de CCL3 estavam aumentados em doenças ósseas inflamatórias caracterizadas por intensa reabsorção óssea, como a doença periodontal (RYU et al., 2007) e a artrite reumatóide (TOH et al., 2004).

O receptor CCR2 também é expresso por monócitos e linfócitos T e é ativado pela quimiocina CCL2 (MCP-1). A quimiocina CCL2 é uma citocina pró-inflamatória que estimula a ativação e quimiotaxia de monócitos do sangue periférico. Essa quimiocina difere das demais por ser relativamente específica para monócitos. Além disso, aumenta a atividade microbicida de macrófagos por estimular a produção de derivados reativos do oxigênio por meio da explosão respiratória nos fagolisossomos (JIANG et al., 1992). A ligação de CCL2 ao CCR2 promove o recrutamento de precursores de osteoclastos para o tecido ósseo (SILVA et al., 2007; BINDER et al., 2009; KIM; DAY; MORRISON, 2005; HOUNOKI et al., 2008). Essa quimiocina também está envolvida no processo de diferenciação dos precursores de osteoclastos em osteoclastos maduros (MIYAMOTO et al., 2009). Kim et al. (2005) realizaram um estudo *in vitro* na qual observaram que a reabsorção óssea estava aumentada na presença de CCL2. Outros estudos demonstraram que os níveis de CCL2 estavam aumentados em condições inflamatórias como doença periodontal (Kurtis *et al.*, 2005), metástases ósseas (LU; KANG, 2009) e osteólise periapical inflamatória (GARLET et al., 2010). Segundo estudo realizado por Miyamoto *et al.* (2009), a CCL2 não induziu a diferenciação de osteoclasto na ausência de RANKL, sugerindo que CCL2 participa da regulação da diferenciação dos osteoclastos de uma maneira autócrina/parácrina sob a estimulação de RANKL.

As quimiocinas desempenham importante papel no recrutamento seletivo de

leucócitos do sangue para sítios inflamatórios, influenciando decisivamente a migração através do endotélio vascular, por estimularem a expressão de moléculas de adesão (SCHALL; BACON, 1994). As quimiocinas CCL2, CCL3 e RANTES estimulam a expressão de moléculas de adesão da família de integrinas beta 2 (CD18/CD11b e CD18/CD11c) por monócitos circulantes, estimulando o extravasamento dessas células para sítios inflamatórios (VADDI; NEWTON, 1994).

Zheng et al. (1998) relataram expressão de RNAm para quimiocina CCL2 em células mononucleares do tumor de células gigantes (TCG), uma lesão histologicamente semelhante à LCCG que ocorre preferencialmente nas epífises de ossos longos e apresenta potencial de causar metástase pulmonar. Esses autores também observaram que o meio obtido de culturas de células do TCG, contendo CCL2, promovia a migração quimiotática de monócitos CD68+ de sangue periférico e que o bloqueio dessa quimiocina, *in vitro*, inibia este processo. Esses dados sugerem que a quimiocina CCL2 produzida pelas células do TCG pode ser importante para o recrutamento de monócitos circulantes, contribuindo para a formação de células gigantes e crescimento das lesões.

Uma vez que as quimiocinas e seus receptores específicos norteiam os processos de migração e são também extremamente importantes no estabelecimento e manutenção de interações celulares, pode-se dizer que a expressão diferencial dessas moléculas em tipos celulares distintos é um fator essencial na determinação da celularidade de lesões, na cinética de formação das lesões, e no desenvolvimento de doenças. Entretanto, na literatura não existem trabalhos avaliando a expressão de quimiocinas e seus receptores nas lesões de células gigantes bucais.

Nosso grupo de pesquisa observou através de técnicas de imunohistoquímica que apenas um percentual mínimo de células mononucleares nas LCCG e LPCG era positivo para o antígeno Ki-67, marcador expresso quase que exclusivamente por células em proliferação, sugerindo que o recrutamento de células do sangue poderia ser um importante mecanismo para o crescimento das lesões (SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000). Nosso grupo também demonstrou que pacientes com LCCG apresentam maiores frequências de linfócitos e monócitos circulantes produtores de citocinas pró e antiinflamatórias, como interferon-gama (IFN- γ), TNF- α e IL-10, quando comparados com indivíduos não acometidos pela doença (SOUZA et al., 2005). Sabendo que células monocíticas podem ser recrutadas para sítios

inflamatórios, formar células gigantes e controlar mecanismos celulares, como a osteoclastogênese, através da produção de mediadores químicos, a avaliação da produção de quimiocinas e a expressão de receptores para essas quimiocinas pode contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento das lesões de células gigantes bucais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a imunomarcção dos receptores de quimiocinas CCR1 e CCR2 na lesão central de células gigantes (LCCG) e na lesão periférica de células gigantes (LPCG).

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a frequência de células gigantes e de células mononucleares que expressam CCR1 e CCR2 na LCCG e a LPCG.
- b) Avaliar a intensidade de expressão de CCR1 e CCR2 nas células gigantes e mononucleares da LCCG e da LPCG.
- c) Comparar a intensidade de expressão e as frequências de células imunomarcadas para CCR1 e CCR2 na LCCG e a LPCG.

3 ARTIGO

Expressão dos receptores CCR1 e CCR2 nas lesões de células gigantes bucais

Marcella Rezende Serpa Zanini¹

Daniela Rodrigues de Faria²

Ricardo Santiago Gomez³

Walderez Ornelas Dutra²

Martinho Campolina Rebelo Horta¹

Paulo Eduardo Alencar de Souza¹

RESUMO

As lesões central de células gigantes (LCCG) e as lesões periféricas de células gigantes (LPCG) são constituídas por células gigantes osteoclásticas e células mononucleares com características fenotípicas e funcionais de macrófagos, de precursores de osteoclastos e de células osteoblásticas. Recentemente, foi demonstrada expressão da interleucina-10, seu receptor (IL-10R) e do receptor de quimiocinas CCR5, sugerindo que mecanismos imunológicos mediados por citocinas e quimiocinas podem participar dos processos relacionados à patogênese dessas lesões. Como a ativação dos receptores de quimiocina CCR1 e CCR2 estimula o recrutamento e a diferenciação de precursores de osteoclasto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de CCR1 e CCR2 na LCCG e na LPCG. Para isso, 9 amostras frescas de LCCG e 10 de LPCG foram obtidos a partir de biópsias. As amostras congeladas foram cortadas e submetidas a reações de imunofluorescência, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CCR1 e anti-CCR2 e anticorpo secundário conjugado a fluorocromo. Análises microscópicas foram

¹ Programa de Mestrado em Odontologia do Departamento de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

² Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

³ Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

realizadas e a percentagem de células positivas para cada parâmetro, bem como a intensidade de fluorescência, foi determinada. Nossos resultados mostraram altas frequências de células CCR1+ e variada frequência de células CCR2+ nas populações de células gigantes e mononucleares em ambas as lesões. Houve correlação positiva entre as frequências de células mononucleares imunomarcadas para CCR1 e CCR2 na LPCG. Tanto as células gigantes, quanto as células mononucleares da LPCG, exibiram maiores frequências de expressão de CCR1 do que de CCR2. A detecção de elevadas frequências de células mononucleares e gigantes expressando CCR1 e CCR2 sugere a participação desses receptores de quimiocina nos processos relacionados ao desenvolvimento das lesões. Investigações sobre a produção de citocinas e quimiocinas ligantes de CCR1 e CCR2 nas lesões de células gigantes poderão esclarecer melhor a imunopatologia da LCCG e da LPCG.

Palavras-chave: Lesão central de células gigantes. Lesão periférica de células gigantes. Receptores de quimiocinas. Osteoclastogênese.

1 INTRODUÇÃO

A lesão central de células gigantes (LCCG) é uma lesão intra-óssea de comportamento clínico variado e prognóstico indeterminado, que acomete os ossos maxilares, preferencialmente em indivíduos antes dos 30 anos de idade e do gênero feminino, podendo apresentar padrão de crescimento agressivo (WHITAKER; WALDRON, 1993; LANGE; AKKER, 2005). A lesão periférica de células gigantes (LPCG) é uma lesão nodular, de coloração vermelha ou vermelho-arroxeadada, que acomete a gengiva ou mucosa alveolar de áreas edêntulas, sendo considerada a contraparte extra óssea da LCCG (LIU et al., 2003; NEVILLE et al., 2009; CHAPARRO-AVENDAÑO; BERINI-AYTÉS; GAY-ESCODA, 2005). Os aspectos histopatológicos da LCCG e da LPCG são idênticos e consistem de numerosas células mononucleares de morfologia variando entre fusiforme e ovóide, permeadas por células gigantes multinucleadas e vasos sanguíneos (WALDRON; SHAFER, 1966; GIANANTI; WALDRON, 1969; DAYAN; BUCHNER; SPIRER, 1990; LIU et al., 2003). As células gigantes presentes nessas lesões apresentam características fenotípicas e funcionais de osteoclastos como expressão de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), receptores de calcitonina e vitronectina (VNR) e

capacidade de reabsorver tecido mineralizado *in vitro* (FLANAGAN et al., 1988; PAMMER et al., 1998; ITONAGA et al., 2003). Além disso, foi detectada nessas lesões expressão de osteoprotegerina (OPG), do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) e seu ligante RANKL, moléculas envolvidas na osteoclastogênese (LIU et al., 2003).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que a maioria das células da LCCG e da LPCG expressa a interleucina-10, seu receptor (IL-10R) e o receptor de quimiocinas CCR5, sugerindo que mecanismos imunológicos mediados por citocinas e quimiocinas podem participar dos processos relacionados à patogênese dessas lesões (SYRIO et al., 2011; SARAIVA, 2008).

As quimiocinas são produzidas por diversos tipos de células teciduais e desempenham suas funções se ligando a receptores de superfície celular. Os receptores CCR1 e CCR5 são ativados pela ligação de quimiocinas, como CCL3 (MIP-1alfa) e CCL5 (RANTES), enquanto receptores CCR2 são ativados pela ligação de CCL2 (MCP-1) (MENTEN; WUYTS; DAMME, 2002). Ativação de CCR1 e CCR2 estimula a ativação e quimiotaxia seletiva de monócitos do sangue periférico (JIANG et al., 1992), o recrutamento de precursores de osteoclastos para o tecido ósseo (SILVA et al., 2007, BINDER et al., 2009; KIM; DAY; MORRISON, 2005; HOUNOKI et al., 2008) e também estimula a diferenciação dos precursores de osteoclastos em osteoclastos maduros, na presença de RANKL (MIYAMOTO et al., 2009; WATANABLE et al., 2004; OBA et al., 2005). Estudos demonstraram expressão aumentada de CCR1 e CCR2 em doenças ósseas inflamatórias bucais, como cistos e granulomas periapicais (SILVA et al., 2005) e periodontite crônica (NODA et al., 2007), e a participação de CCR2 e CCR5 no processo de reabsorção óssea durante movimento dentário ortodôntico (ANDRADE et al., 2009; TADDEI et al., 2012).

Uma vez que as quimiocinas e seus receptores específicos norteiam os processos de migração e são também extremamente importantes no estabelecimento e manutenção de interações celulares, pode-se dizer que a expressão diferencial dessas moléculas em tipos celulares distintos é um fator essencial na determinação da celularidade de lesões, na cinética de formação das lesões, e no desenvolvimento de doenças. Entretanto, na literatura não existem trabalhos avaliando a expressão de quimiocinas e seus receptores nas lesões de células gigantes bucais.

Nosso grupo de pesquisa observou através de técnicas de imunohistoquímica

que apenas um percentual mínimo de células mononucleares nas LCCG e LPCG era positivo para o antígeno Ki-67, marcador expresso quase exclusivamente por células em proliferação, sugerindo que o recrutamento de células do sangue poderia ser um importante mecanismo para o crescimento das lesões (SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000). Também demonstrou-se que pacientes com LCCG apresentam maiores frequências de linfócitos e monócitos circulantes produtores de citocinas pró e antiinflamatórias, como interferon-gama (IFN- γ), TNF- α e IL-10, quando comparados com indivíduos não acometidos pela doença (SOUZA et al., 2005). Sabendo que células monocíticas podem ser recrutadas para sítios inflamatórios, formar células gigantes e controlar mecanismos celulares, como a osteoclastogênese, através da produção de mediadores químicos, a avaliação da produção de quimiocinas e a expressão de receptores para essas quimiocinas pode contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento nestas lesões. Desse modo, o objetivo deste estudo foi avaliar por meio de imunofluorescência a expressão dos receptores de quimiocinas CCR1 e CCR2 pelas células gigantes e mononucleares da LCCG e da LPCG.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seleção dos pacientes

Foram selecionados dezenove amostras para este estudo: 9 pacientes portadores de lesão central de células gigantes (LCCG) e 10 de lesão periférica de células gigantes (LPCG). Os critérios de seleção foram baseados em exames clínicos, radiográficos e análises anatomopatológicas de fragmentos de lesões obtidos por meio de biópsias. Todos os procedimentos relacionados a esta pesquisa foram submetidos aos Comitês de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas) e da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e aprovados segundo as normas destes comitês.

2.2 Obtenção e processamento das amostras

Os fragmentos de LCCG e de LPCG foram obtidos a partir de biópsias, curetagens ou excisões cirúrgicas realizadas nas Clínicas do Departamento de

Odontologia da PUC Minas e da UFMG, em Belo Horizonte. Parte de cada amostra foi enviada ao Laboratório de Patologia Bucal do Departamento de Odontologia da PUC Minas para confirmação do diagnóstico através de exame anatomopatológico. O restante foi mergulhado em tampão fosfato-salina (PBS) contendo 30% de sacarose a 4°C, por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram embebidas em meio de inclusão para congelamento (*Tissue Tek-OCT*), congeladas em freezer a -20°C por 1 hora e depois transferidas para freezer -80°C, aí permanecendo até o momento do processamento.

A partir dos fragmentos de lesão congelados foram obtidos cortes histológicos de 5µm de espessura em criostato. Os cortes foram estendidos sobre lâminas de vidro (*Superfrost Micro Slides - VWR Scientific*) e estas imediatamente incubadas em acetona por 10 minutos a -20°C, para fixação dos tecidos. Após fixação, as lâminas com os cortes foram armazenadas em freezer a -80°C.

Para certificarmos a qualidade e preservação do tecido, um corte obtido em criostato de cada fragmento foi submetido à coloração histológica por hematoxilina/eosina e avaliado em microscópio de luz.

2.3 Reações de imunofluorescência

Para avaliação da expressão dos receptores CCR1 e CCR2 pelas células das lesões, foram realizadas reações de imunofluorescência nos cortes de lesões congeladas, utilizando metodologia semelhante à descrita por Faria *et al.*, em 2005. Os cortes histológicos foram lavados em 5 banhos de PBS resfriado, por 3 minutos cada, e o excesso de tampão foi removido com papel filtro. Para reduzir as marcações inespecíficas, foi realizado bloqueio com solução de PBS e albumina bovina (BSA) 3%, através de incubação em câmara úmida por 40 minutos. O excesso de solução de bloqueio foi removido com papel filtro e foi adicionado anticorpo monoclonal de camundongo anti-CCR1 (catálogo MAB 145, clone 53504, *R&D Systems*) diluído 1:40 em PBS/BSA 3% e anticorpo monoclonal de camundongo anti-CCR2 (catálogo MAB 150, clone 48607, *R&D Systems*) diluído 1:40 em PBS/BSA 3%. As diluições dos anticorpos foram testadas previamente. Os cortes foram incubados em câmara úmida por 15 horas a 4°C e em seguida, submetidos a 5 banhos de PBS, por 3 minutos cada. Em seguida foram incubados

com PBS/BSA 3% a temperatura ambiente durante 40 minutos. O excesso de solução foi removido com papel filtro e foram adicionados cerca de 40 µl de solução de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (catalogo A21050, *Molecular Probes*) conjugado ao fluorocromo Cy3 diluído 1:200 e 4',6'-diamidino-2-fenilindole (DAPI) diluído 1:300 em PBS/BSA a 3%. Após incubação em câmara úmida ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, durante uma hora, os cortes foram lavados com PBS e as lâminas montadas com *Hidromount* (*National Dignostic*). As lâminas foram mantidas a 4°C, protegidas da luz, até que fosse realizada a aquisição das imagens ao microscópio confocal (*Meta-510 Zeiss, Thornwood, WV, USA*). Controle negativo, por meio da omissão dos anticorpos primários, e controle de isotipo IgG1-PE (*Becton & Dickinson – CA, USA*), foram analisados separadamente para confirmar a ausência de imunomarcação inespecífica.

2.4 Aquisição, processamento e análise das imagens

A técnica de microscopia confocal por varredura a laser utiliza uma combinação de recursos de microscopia óptica aliados a princípios de mecânica quântica, físico-química e computação para aquisição e processamento de imagens. Ao serem excitados por uma fonte de energia, os fluorocromos conjugados aos anticorpos emitem fluorescência em espectros de comprimentos de onda distintos, o que permite a identificação de cada marcação, através da utilização de filtros específicos contidos no microscópio.

As análises foram realizadas utilizando-se sistema de scanner de laser confocal *Meta-510 Zeiss* acoplado ao microscópio Zeiss (*Axiovert 100*), por meio do *software LSMix*, com objetiva *Plan-Apochromat* de imersão em óleo de 40X. Uma lâmpada de mercúrio foi utilizada para excitar o DAPI, através da linha 20/80nm, e um laser de argônio e neônio para excitar o fluorocromo Cy3, através da linha 543nm. A luz emitida foi selecionada utilizando-se filtro *band pass* 363/90 para DAPI e filtro *long pass* 560 para Cy3.

Para cada imunomarcação, foram feitas aquisições de imagens de dez campos consecutivos, no aumento final de 400x, em áreas características das lesões, contendo células gigantes. As imagens obtidas foram armazenadas no computador para posterior análise. Os programas *LSMix* e *Adobe Photoshop 7.0* foram utilizados para o processamento das imagens e contagem das células. Para

cada lâmina, foi realizada contagem do número total de células mononucleares e de células gigantes em quatro dos dez campos capturados, por meio da contagem dos núcleos positivos para DAPI. Em seguida, foi realizada a contagem das células positivas para CCR1 e CCR2, obtendo-se a percentagem de células gigantes e mononucleares positivas para cada marcador. Em cada amostra foram contadas pelo menos 700 células mononucleares. Foi realizada, também, avaliação qualitativa da intensidade da imunomarcacão de CCR1 e CCR2 nas lesões em fraca, moderada e forte. Para análise estatística foram atribuídos os seguintes valores numéricos: fraca intensidade = 1; moderada intensidade = 2 e forte intensidade = 3. Todas as análises foram realizadas por um único observador experiente, de forma cega.

2.5 Analise estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando-se software Prisma grafic. Após obtenção das frequências de células positivas e da intensidade de fluorescência para cada marcador, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparações entre os grupos de LCCG e LPCG e o teste de Wilcoxon para comparações entre a expressão dos marcadores dentro do grupo de LCCG e do grupo de LPCG. O teste de análise de correlação de Spearmann foi realizado para verificar a existência de correlação entre a expressão dos receptores de quimiocinas. O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a distribuição das amostras quanto à normalidade e o nível de significância considerado foi de 5%.

3 RESULTADOS

Para avaliarmos se as células gigantes e mononucleares da LCCG e da LPCG expressam os receptores de quimiocinas CCR1 e CCR2, foram realizadas reações de imunofluorescência nos cortes histológicos das lesões utilizando anticorpo secundário conjugado a Cy3. Nós observamos que tanto células gigantes como células mononucleares de ambas as lesões expressam os receptores CCR1 e CCR2 (Fig. 1 e 2).

Enquanto o padrão de expressão de CCR1 não variou muito entre as amostras de ambas as lesões, a frequência de células positivas e a intensidade de

fluorescência das imunomarcações para CCR2 foram bastante variadas tanto na LCCG quanto na LPCG. Além disso, dentro de uma mesma lesão pode-se observar variações entre a intensidade de fluorescência entre células gigantes e mononucleares (Fig. 2).

Para compararmos as frequências de células mononucleares e gigantes positivas para cada marcador entre a LCCG e a LPCG, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados mostraram não haver diferenças significativas nas frequências de células mononucleares ou gigantes positivas para CCR1 ou CCR2, entre os grupos LCCG e LPCG (Tabela 1).

TABELA 1 - Frequência de células gigantes e mononucleares positivas para o receptor de quimiocina CCR1 e CCR2 nos casos de LCCG e LPCG.

CÉLULAS	LESÃO	MEDIANA	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	Valor de p*
% células mononucleares CCR1+	LCCG	100	4,41	100	n.s.
	LPCG	92,11	27,42	100	
% células mononucleares CCR2+	LCCG	91,42	7,18	100	n.s.
	LPCG	48,81	7,29	96,05	
% células gigantes CCR1+	LCCG	100	81,81	100	n.s.
	LPCG	100	83,33	100	
% células gigantes CCR2+	LCCG	100	12,5	100	n.s.
	LPCG	38,08	0	100	

* valores de p foram obtidos pelo teste Mann-Whitney.
n.s.: não significante.

Figura 1 – Imunomarcacão para CCR1 nos casos de LCCG e LPCG. (A e D) Imagens representativas das análises de microscopia confocal da expressão de CCR1 na LCCG e LPCG, respectivamente, mostrando sobreposições de CCR1 (vermelho) e DAPI (azul). **(B e E)** mostram detalhe das células gigantes CCR1 positivas. **(C e F)** mostram detalhe das células mononucleares CCR1 positivas

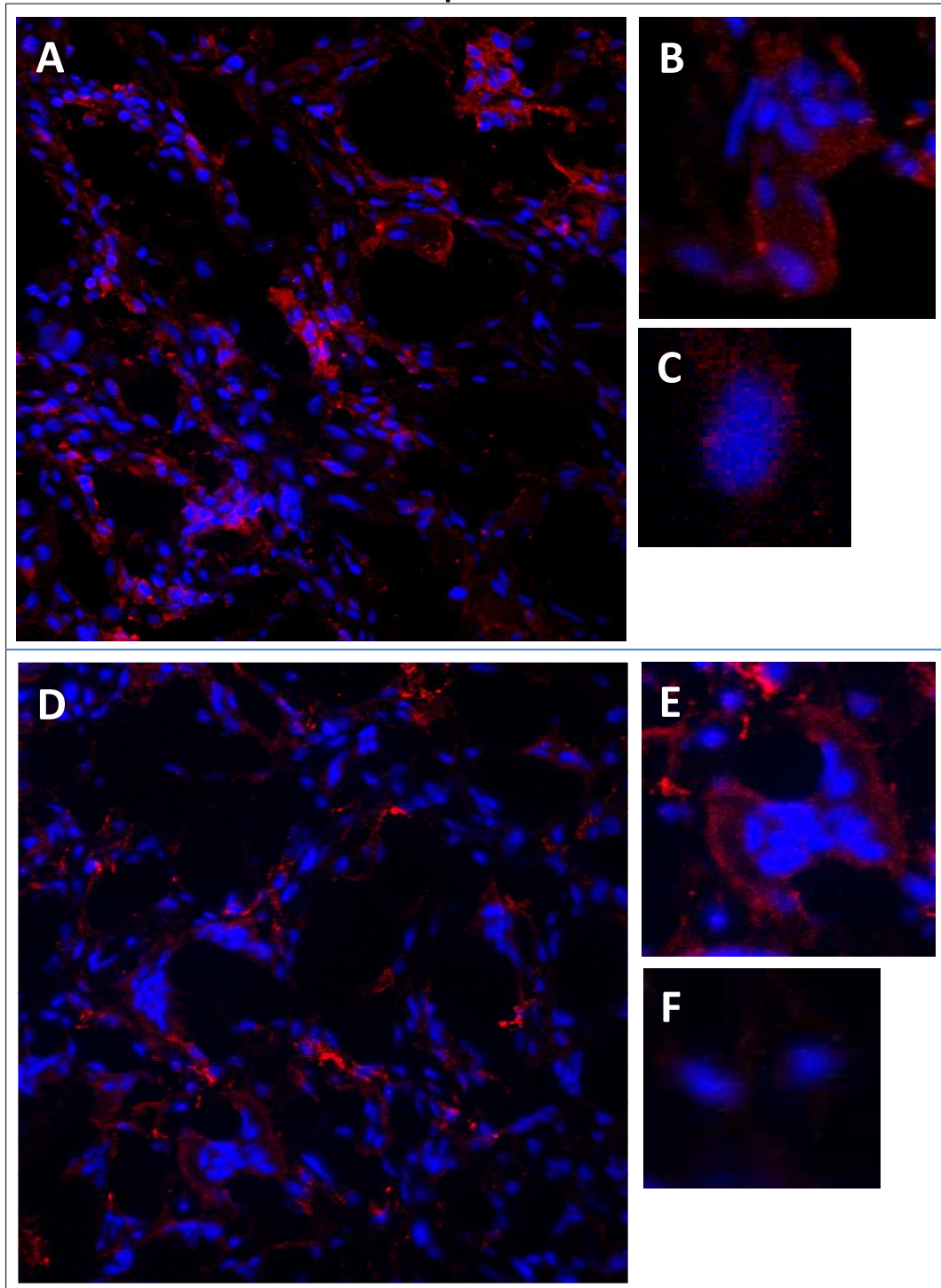
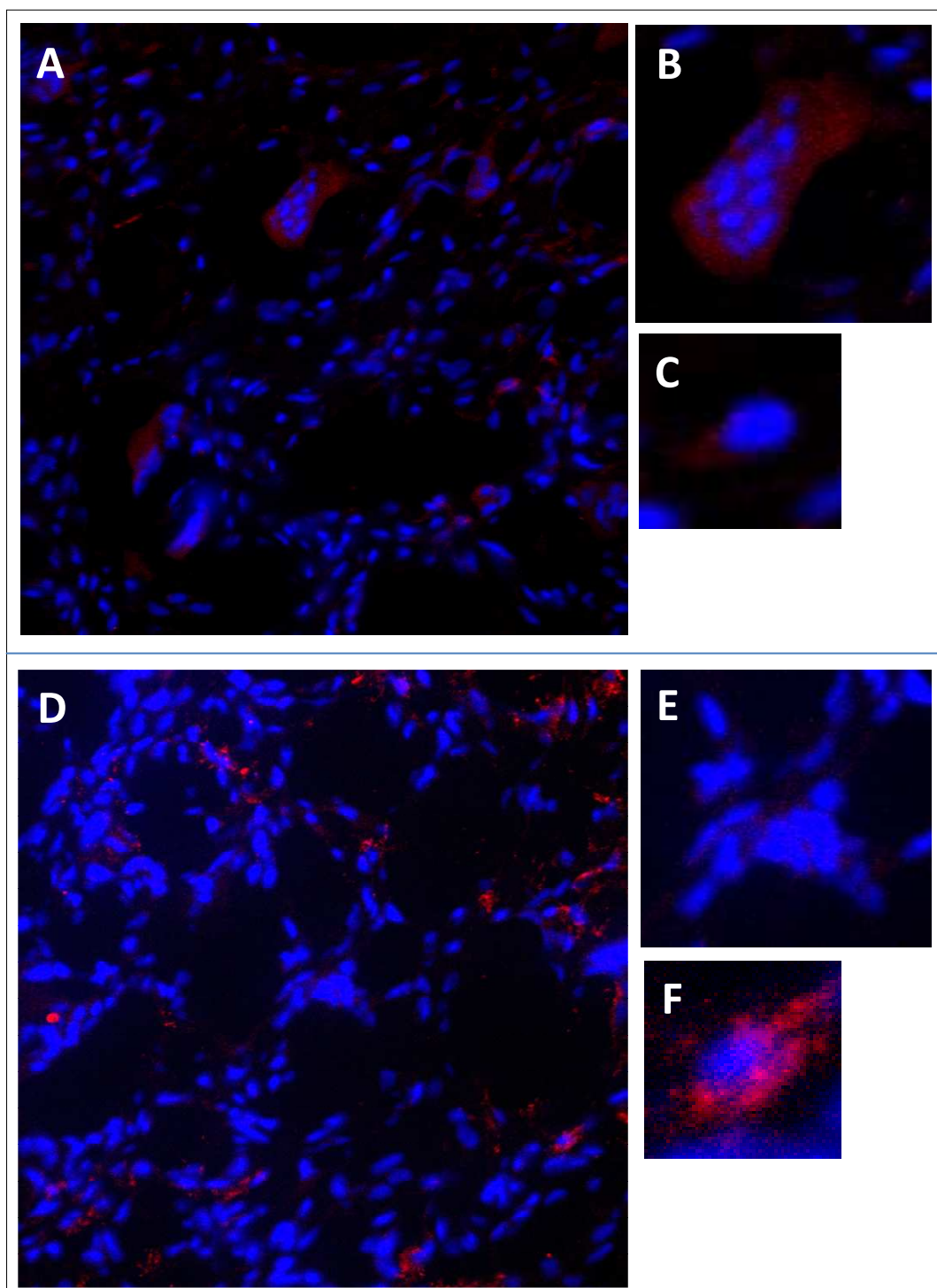


Figura 2 – Imunomarcacão para CCR2 nos casos de LCCG e LPCG. (A e D) Imagens representativas das análises de microscopia confocal da expressão de CCR2 na LCCG e LPCG, respectivamente, mostrando sobreposições de CCR2 (vermelho) e DAPI (azul). (B e E) mostram detalhe das células gigantes CCR2 positivas. (C e F) mostram detalhe das células mononucleares CCR2 positivas



Para verificarmos se há diferença na frequência de células mononucleares e gigantes que expressam CCR1 e CCR2 nas amostras estudadas, foi utilizado o teste de Wilcoxon. Os resultados mostraram que as percentagens de células gigantes e mononucleares da LPCG que expressam CCR1 foram maiores que as frequências de células positivas para CCR2 (Tabela 2). Nas amostras de LCCG não foram observadas diferenças significativas quanto às frequências de células positivas para CCR1 e CCR2 (Tabela 2). Para constatar se havia correlação entre as frequências de células positivas para CCR1 e para CCR2 nas amostras estudadas realizamos teste de Spearmann. Os resultados mostraram haver correlação positiva ($r_s=0,754$) entre a frequência de células mononucleares positivas para CCR1 e CCR2 somente na LPCG (Tabela 2).

TABELA 2 – Comparação entre as frequências de células gigantes e mononucleares positivas para CCR1 e CCR2 nos casos de LCCG e LPCG.

		CCR1	CCR2	Valor de p*	Valor de p**
LCCG	% células mononucleares	100	91,42	n.s.	n.s.
	% células gigantes	100	100	n.s.	n.s.
LPCG	% células mononucleares	92,11	48,81	p<0,05	p<0,05 ($r_s=0,754$)
	% células gigantes	100	38,08	p<0,05	n.s.

* valores de p obtidos pelo teste Wilcoxon.

** valores de p obtidos pelo teste de correlação de Spearmann.

n.s: não significante.

Independentemente da frequência de células positivas para cada marcador nas amostras estudadas, observou-se que a intensidade da imunomarcção foi variada. A intensidade de fluorescência é um parâmetro relacionado à quantidade de antígeno (CCR1 ou CCR2) presente em cada célula positiva. Para compararmos a intensidade de fluorescência da imunomarcção para CCR1 e CCR2 pelas células das lesões, utilizamos os testes de Mann-Whitney e Wilcoxon. Os resultados mostraram não haver diferenças significativas entre as intensidades de fluorescência de CCR1 e CCR2 entre a LCCG e a LPCG (Tabela 3). Também não foram detectadas diferenças significativas entre a intensidade de expressão de CCR1 e CCR2 dentro de cada grupo de lesões analisado (Tabela 3).

TABELA 3 – Intensidade de fluorescência da imunomarcação para CCR1 e CCR2 nas células gigantes e mononucleares da LCCG e da LPCG

	Intensidade de fluorescência	LCCG	LPCG	Valor de p*
CCR1	fraca	5 (55,6%)	4 (40%)	n.s.
	moderada	0	1 (10%)	
	forte	4 (44,4%)	5 (50%)	
CCR2	fraca	3 (37,5%)	5 (62,5%)	n.s.
	moderada	2 (25%)	2 (25%)	
	forte	3 (37,5%)	1 (12,5%)	
Valor de p**		n.s.	n.s.	

* valores de p foram obtidos pelo teste Mann-Whitney.

** valores de p foram obtidos pelo teste Wilcoxon.

n.s: não significante.

4 DISCUSSÃO

A LCCG e a LPCG são lesões de patogênese ainda desconhecida, classificadas como lesões proliferativas não neoplásicas. Embora a etiologia seja desconhecida, os aspectos clínicos e histopatológicos sugerem que essas lesões sejam de natureza inflamatória (BONETTI et al., 1990; CHAPARRO-AVENDAÑO; BERINI-AYTÉS; GAY-ESCODA, 2005). Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que a maioria das células da LCCG e da LPCG expressa a interleucina-10 e seu receptor (IL-10R), sugerindo que mecanismos imunológicos mediados por citocinas podem participar dos processos relacionados à patogênese dessas lesões (SYRIO et al., 2011). Além disso, quase a totalidade das células mononucleares e todas as células gigantes de ambas as lesões expressam o receptor de quimiocina CCR5, reforçando a idéia de que os mediadores imunoinflamatórios podem ter papel importante no estabelecimento dessas lesões (SARAIVA, 2008).

Nesse trabalho, nós demonstramos que células gigantes e mononucleares da LCCG e da LPCG expressam os receptores de quimiocinas CCR1 e CCR2. Ao quantificarmos as imunomarcações para CCR1 e CCR2, verificamos na maioria dos casos estudados altas frequências de células gigantes e mononucleares positivas para esses receptores.

A ligação de quimiocinas aos receptores CCR1 e CCR2 estimula a ativação e quimiotaxia seletiva de monócitos do sangue periférico (JIANG et al., 1992), o

recrutamento de precursores de osteoclastos para o tecido ósseo (SILVA et al., 2007, BINDER et al., 2009; KIM; DAY; MORRISON, 2005; HOUNOKI et al., 2008) e a diferenciação dos precursores de osteoclastos em osteoclastos maduros, na presença de RANKL (MIYAMOTO et al., 2009; WATANABLE et al., 2004; OBA et al., 2005).

Investigações sobre a caracterização das células da LCCG e da LPCG têm mostrado que as células gigantes multinucleadas apresentam características fenotípicas e funcionais de osteoclastos e expressam RANK e OPG. Entre as células mononucleares, algumas exibem características de precursores de osteoclastos, como positividade para TRAP e RANK, enquanto outras expressam RANKL e OPG, citocinas características de células osteoblásticas (LIU et al., 2003). A ligação de RANKL ao RANK expresso na superfície de precursores de osteoclastos induz a fusão e diferenciação dessas células, além da ativação e sobrevivência dos osteoclastos (LANGE; AKKER; BERG, 2007). Enquanto a ativação de RANK induz a expressão do fator nuclear de células T ativadas (NFAT), o qual estimula a expressão do receptor CCR1, e a inibição de NFAT reduz a produção de CCR1, inibindo a quimiotaxia dos precursores de osteoclastos (ISHIDA et al., 2006). Um estudo recente mostrou aumento da transcrição de uma isoforma de NFAT (NFATc1), principalmente nas células gigantes multinucleadas da LCCG e da LPCG (AMARAL et al., 2010). Assim, a alta expressão de CCR1 observada em nosso trabalho pode ser decorrente, pelo menos em parte, da ativação da via de sinalização mediada pelo NFAT nas lesões de células gigantes bucais.

Nossos resultados mostraram não haver diferenças significativas nas frequências e intensidades de expressão de CCR1 e CCR2 entre a LCCG e a LPCG, sugerindo que os processos patológicos estimulados por esses receptores de quimiocinas possam, em princípio, atuar de forma semelhante nas lesões. Entretanto, quando comparamos a expressão de CCR1 com CCR2 dentro do mesmo grupo de lesões, observamos maiores frequências de células gigantes e mononucleares CCR1+ do que CCR2+ somente na LPCG. Esse achado sugere que na LPCG o crescimento das lesões pelo recrutamento seletivo de monócitos do sangue e a formação de células gigantes podem ser controlados preferencialmente pela via de sinalização de CCR1. Como as citocinas são as principais indutoras da produção seletiva de quimiocinas e da expressão de receptores de quimiocinas (MENTEN; WUYTS; DAMME, 2002), a proximidade das LPCGs com fatores

irritativos locais como placa bacteriana e fatores traumáticos locais poderia determinar a ocorrência de um microambiente com padrões distintos de citocinas, influenciando o perfil de quimiocinas.

Embora a maioria dos casos de LCCG e LPCG apresente altas frequências de células gigantes e mononucleares positivas para CCR1 e CCR2, algumas amostras exibiram baixas frequências de células positivas para ambos ou um dos receptores de quimiocinas avaliados. Como os receptores CCR1 e CCR2 estão diretamente envolvidos no processo de recrutamento e diferenciação de precursores de osteoclastos, é possível que algumas lesões analisadas estivessem em uma fase de menor indução de osteoclastogênese, determinada por alterações no balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias. Vários estudos demonstraram o papel modulador de diferentes citocinas na osteoclastogênese e reabsorção óssea (ANDRADE et al., 2009; KOMATSU; TAKAYANAGI, 2012). Por outro lado, a menor expressão de CCR1 e CCR2 em algumas amostras estudadas poderia indicar ativação excessiva das vias de sinalização induzidas pelos receptores de quimiocinas, uma vez que esses podem ser rapidamente regulados negativamente pela exposição a quimiocina, constituindo um dos prováveis mecanismos de finalização das respostas imunoinflamatórias (MENTEN; WUYTS; DAMME, 2002).

No tecido ósseo vários tipos de quimiocinas atuam ao mesmo tempo estimulando diferentes vias moleculares (MENTEN; WUYTS; DAMME, 2002) e dessa forma o balanço entre a expressão das diferentes quimiocinas e seus receptores influenciada por diversos mediadores como citocinas e fatores de crescimento pode determinar a maior reabsorção ou formação óssea.

As altas frequências de células expressando receptores de quimiocinas envolvidos na osteoclastogênese, como CCR1, CCR2 e CCR5, nas lesões de células gigantes bucais poderiam explicar, em parte, a formação continua e a sobrevivência de células osteoclásticas no interior das lesões, sem contato com a superfície de matriz óssea. Investigações sobre a produção de quimiocinas e sobre as vias de sinalização molecular relacionadas às quimiocinas são necessárias para elucidar os mecanismos envolvidos na etiopatogênese da LCCG e da LPCG.

ABSTRACT

Central giant cell lesions (CGCL) and peripheral giant cell lesions (PGCL) are constituted by multinucleated (osteoclastic-like) giant cells in a background of mononuclear cells expressing functional and phenotypic characteristics of macrophages, osteoclast precursors and osteoblastic cells. Recently, it has been demonstrated the expression of interleukin-10, its receptor (IL-10R) and chemokine receptor CCR5, which suggests that immunological mechanism mediated by cytokines and chemokines should participate in pathogenic process of those lesions. Insofar as the activation of chemokine receptors CCR1 and CCR2 stimulate osteoclast precursors recruitment and differentiation, the purpose of this study was to evaluate both CCR1 and CCR2 expression in CGCL and PGCL. Thus, 9 CGCL sampler and 10 PGCL were obtained from surgical excision. Frozen specimens were cut and subjected to immunofluorescence staining using anti-CCR1 and anti-CCR2 monoclonal antibodies and fluorochrome-labelled secondary antibody. Microscopic analyses were performed and the percentage of positive mononuclear and giant cells for each parameter was obtained, besides their fluorescence intensity. The results show high frequency of CCR1+ cells and variated frequency of CCR2+ cells in giant and mononuclear cell populations in both lesions. There was positive correlation between frequencies of CCR1 and CCR2 immunomarked mononuclear cells on PGCL. Both giant and mononuclear cells on PGCL showed higher frequencies of CCR1 expression than CCR2. High frequencies of giant and mononuclear cells expressing CCR1 and CCR2 suggest the participation of those chemokine receptors in lesion's development. Further investigations about the production of cytokines and chemokine and CCR1 and CCR2 chemokine ligands in giant cell lesions shall elucidate the immunopathology of CGCL and PGCL.

Keywords: Central giant cell lesions. Peripheral giant cell lesions. Chemokine receptors. Osteoclastogenesis.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro. Os dados microscópicos mostrados neste trabalho foram obtidos utilizando os microscópios e equipamentos do Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL-ICB / UFMG).

REFERÊNCIAS

- AMARAL, Fabrício Rezende et al. NFATc1 and TNFa expression in giant cell lesions of the jaws. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n. 3, p. 269-274, Mar. 2010.
- ANDRADE, I. Jr. et al. CCR5 down-regulates osteoclast function in orthodontic tooth movement. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 11, p. 1037-1041, Nov. 2009.
- BINDER, N.B. et al. Estrogen-dependent and C-C chemokine receptor-2-dependent pathways determine osteoclast behavior in osteoporosis. **Nature Medicine**, v. 15, n. 4, p. 417-424, Apr. 2009.
- BONETTI, F. et al. Peripheral giant cell granuloma: evidence for osteoclastic differentiation. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology**, v. 70, n. 4, p. 471-475, Oct. 1990.
- CHAPARRO-AVENDAÑO, A.V.; BERINI-AYTÉS, L.; GAY-ESCODA, C. Peripheral giant cell granuloma. A report of five cases and review of the literature. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 10, n. 1, p. 48-57, Jan-Feb. 2005.
- DAYAN, D.; BUCHNER, A.; SPIRER, S. Bone formation in peripheral giant cell granuloma. **Journal of Periodontology**, v.61, n. 7, p.444-446, Jul. 1990.
- FLANAGAN, A.M. et al. The multinucleated cells in giant cell granulomas of the jaws are osteoclasts. **Cancer**, v.62, n. 6, p.1139-1145, Sep. 1988.
- GIANSANTI, J.S.; WALDRON, C.A. Peripheral giant cell granuloma: review of 720 cases. **Journal of Oral Surgery**, v.27, n.10, p.787-791, Oct. 1969.
- HOUNOKI, H. et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits TNF-alpha-mediated osteoclast differentiation in human peripheral monocytes in part via suppression of monocyte chemoattractant protein-1 expression. **Bone**, v. 42, n. 4, p. 765-774, Apr. 2008.
- ISHIDA, N. et al. CCR1 acts downstream of NFAT2 in osteoclastogenesis and enhances cell migration. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 21, n. 1, p. 48-57, Jan. 2006.

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

JIANG, Y. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. **Journal of Immunology**, v.148, n. 8, p. 2423-2428, Apr. 1992.

KIM, M.S.; DAY, C.J.; MORRISON, N.A. MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 16, p. 16163-16169, Apr. 2005.

KOMATSU, N.; TAKAYANAGI, H. Inflammation and bone destruction in arthritis: synergistic activity of immune and mesenchymal cells in joints. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2012.

LANGE, J.; AKKER, H.P. Clinical and radiological features of central giant-cell lesions of the jaw. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 99, n. 4, p. 464-470, Apr. 2005.

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

LIU, B.; YU, S.F.; LI, T.J. Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 32, n. 6, p. 367-375, Apr. 2003.

MENTEN, P.; WUYTS, A.; DAMME, J.V. Macrophage inflammatory protein-1. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v.13, n. 6, p.455-481, Dec. 2002.

MIYAMOTO, K. et al. MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 383, n.3, p. 373-377, Jun. 2009.

NEVILLE, Brad W. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. Cap. 12 e 14, p. 522 e 628-630.

NODA, D. et al. Relationship between the presence of periodontopathic bacteria and the expression of chemokine receptor mRNA in inflamed gingival tissues. **Journal of Periodontal Research**, v. 42,n. 6, p. 566-571, Dec. 2007.

OBA, Y. et al. MIP-1 α utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells. **Experimental Hematology**, v. 33, n. 3, p. 272-278, Mar. 2005.

PAMMER, J. et al. Expression of regulatory apoptotic proteins in peripheral giant cell

granulomas and lesions containing osteoclast-like giant cells. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.27, n. 6, p.267-271, Jul. 1998.

SARAIVA, Adriana Machado. **Avaliação da expressão do receptor de quimiocina CCR5 nas lesões de células gigantes bucais**. 2008. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Belo Horizonte.

SILVA, T.A. et al. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 5, p. 310-316, Oct. 2005.

SILVA, T.A. et al. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 4, p. 306-319, Apr. 2007.

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

SOUZA, Paulo Eduardo Alencar de et al. Systemic leukocyte activation in patients with central giant cell lesions. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.34, n. 5, p.312-317, May. 2005.

SYRIO, Nárriman-Fátima-Lima et al. IL-10 and IL-10 receptor overexpression in oral giant cell lesions. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 16, n. 4, p. 488-492, Jul. 2011.

TADDEI, S.R. et al. Role of CCR2 in orthodontic tooth movement. **American Journal of Orthodontics Dentofacial Orthopedics**, v. 141, n. 2, p. 153-160, Feb. 2012.

WALDRON, C.A.; SHAFER, W.G. The central giant cell reparative granuloma of the jaws. An analysis of 38 cases. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.437-447, Apr. 1966.

WATANABE, T. et al. Direct stimulation of osteoclastogenesis by MIP-1alpha: evidence obtained from studies using RAW264 cell clone highly responsive to RANKL. **Journal of Endocrinology**, v. 180, n. 1, p. 193-201, Jan. 2004.

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

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As altas frequências de células expressando receptores de quimiocinas envolvidos na osteoclastogênese, como CCR1, CCR2 e CCR5, nas lesões de células gigantes bucais podem explicar, em parte, a formação continua e a sobrevivência de células osteoclásticas no interior das lesões.

São necessárias mais investigações sobre a produção de quimiocinas e sobre as vias de sinalização molecular relacionada às quimiocinas para elucidar os mecanismos envolvidos na etiopatogênese dessas lesões.

REFERÊNCIAS

- ABBAS A.K.; LICHTMAN A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 579p.
- AMARAL, Fabrício Rezende et al. NFATc1 and TNFa expression in giant cell lesions of the jaws. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n. 3, p. 269-274, Mar. 2010.
- ANDRADE, I. Jr. et al. CCR5 down-regulates osteoclast function in orthodontic tooth movement. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 11, p. 1037-1041, Nov. 2009.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. **Journal of Internal Medicine**, v. 250, n. 2, p. 91-104, Aug. 2001.
- BHASKAR, S.N. et al. Giant cell reparative granuloma (peripheral): report of 50 cases. **Journal of Oral Surgery**, v.29, n.2, p. 110-115, Feb. 1971.
- BINDER, N.B. et al. Estrogen-dependent and C-C chemokine receptor-2-dependent pathways determine osteoclast behavior in osteoporosis. **Nature Medicine**, v. 15, n. 4, p. 417-424, Apr. 2009.
- BONETTI, F. et al. Peripheral giant cell granuloma: evidence for osteoclastic differentiation. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology**, v. 70, n. 4, p. 471-475, Oct. 1990.
- CARLOS, R.; SEDANO, H.O. Intralesional corticosteroids as an alternative treatment for central giant cell granuloma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 93, n.2, p. 161-166, Feb. 2002.
- CARVALHO, Y.R. et al. Peripheral giant cell granuloma. An immunohistochemical and ultrastructural study. **Oral Diseases**, v.1, n. 1, p.20-25, Mar. 1995.
- CARVALHO, Vinícius Magalhães et al. Novel mutations in the SH3BP2 gene associated with sporadic central giant cell lesions and cherubism. **Oral Diseases**, v. 15, n. 1, p. 106-110, Jan. 2009.
- CHAPARRO-AVENDAÑO, A.V.; BERINI-AYTÉS, L.; GAY-ESCODA, C. Peripheral giant cell granuloma. A report of five cases and review of the literature. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 10, n. 1, p. 48-57, Jan-Feb. 2005.
- CHUONG, R. et al. Central giant cell lesions of the jaws: a clinicopathologic study. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v.44, n. 9, p. 708-713, Sep. 1986.
- DAYAN, D.; BUCHNER, A.; SPIRER, S. Bone formation in peripheral giant cell granuloma. **Journal of Periodontology**, v.61, n. 7, p.444-446, Jul. 1990.
- FLANAGAN, A.M. et al. The multinucleated cells in giant cell granulomas of the jaws are osteoclasts. **Cancer**, v.62, n. 6, p.1139-1145, Sep. 1988.

GARLET, T.P. et al. CCR2 deficiency results in increased osteolysis in experimental periapical lesions in mice. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 2, p. 244-250. Feb. 2010.

GIANSANTI, J.S.; WALDRON, C.A. Peripheral giant cell granuloma: review of 720 cases. **Journal of Oral Surgery**, v.27, n.10, p.787-791, Oct. 1969.

HOUNOKI, H. et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits TNF-alpha-mediated osteoclast differentiation in human peripheral monocytes in part via suppression of monocyte chemoattractant protein-1 expression. **Bone**, v. 42, n. 4, p. 765-774, Apr. 2008.

ISHIDA, N. et al. CCR1 acts downstream of NFAT2 in osteoclastogenesis and enhances cell migration. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 21, n. 1, p. 48-57, Jan. 2006.

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

JIANG, Y. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. **Journal of Immunology**, v.148, n. 8, p. 2423-2428, Apr. 1992.

KATSIKERIS, N.; KAKARANTZA-ANGELOPOULOU, E.; ANGELOPOULOS, A.P. Peripheral giant cell granuloma. Clinicopathologic study of 224 new cases and review of 956 reported cases. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v.17, n. 2, p.94-99, Apr. 1988.

KIM, M.S.; DAY, C.J.; MORRISON, N.A. MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 16, p. 16163-16169, Apr. 2005.

KOMATSU, N.; TAKAYANAGI, H. Inflammation and bone destruction in arthritis: synergistic activity of immune and mesenchymal cells in joints. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2012.

KURTIS, B. et al. Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.76, n. 11, p. 1849-1855, Nov. 2005.

LANGE, J.; AKKER, H.P. Clinical and radiological features of central giant-cell lesions of the jaw. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 99, n. 4, p. 464-470, Apr. 2005.

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

LEBAN, S.G. et al. The giant cell lesions of jaws: neoplastic or reparative? **Journal Oral Surgery**, v.29, p.398-404, 1971.

LEE, J.E. et al. Stimulation of osteoclastogenesis by enhanced levels of MIP-1alpha in BALB/c mice in vitro. **Experimental Hematology**, v.35, n. 7, p. 1100-1108, Jul. 2007.

LIM, L.; GIBBINS, J.R. Immunohistochemical and ultrastructural evidence of a modified microvasculature in the giant cell granuloma of the jaws. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v.79, n. 2, p. 190-198, Feb. 1995.

LIU, B.; YU, S.F.; LI, T.J. Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 32, n. 6, p. 367-375, Apr. 2003.

LIETMAN, S.A.; YIN, L.; LEVINE, M.A. SH3BP2 is an activator of NFAT activity and osteoclastogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 371, n. 4, p.644-648, Jul. 2008.

LU, X.; KANG, Y. Chemokine (C-C motif) ligand 2 engages CCR2+ stromal cells of monocytic origin to promote breast cancer metastasis to lung and bone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 42, p. 29087-29096, Oct. 2009.

MENTEN, P.; WUYTS, A.; DAMME, J.V. Macrophage inflammatory protein-1. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v.13, n. 6, p.455-481, Dec. 2002.

MILLER, M.D.; KRANGEL, M.S. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. **Critical Reviews in Immunology**, v.12, n. 1-2, p.17-46, 1992.

MOROHASHI, H. et al. Expression of both types of human interleukin-8 receptors on mature neutrophils, monocytes, and natural killer cells. **Journal Leukocyte Biology**, v. 57, n. 1, p. 180-187, Jan.1995.

MIYAMOTO, K. et al. MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 383, n.3, p. 373-377, Jun. 2009.

MURPHY, P.M. et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 145–176. 2000.

NEVILLE, Brad W. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. Cap. 12 e 14, p. 522 e 628-630.

NODA, D. et al. Relationship between the presence of periodontopathic bacteria and the expression of chemokine receptor mRNA in inflamed gingival tissues. **Journal of Periodontal Research**, v. 42, n. 6, p. 566-571, Dec. 2007.

NOVACK, D.V.; FACCIO, R. Jawing about TNF: new hope for cherubism. **Cell**, v.128, n. 1, p. 15-17, Jan. 2007.

OBA, Y. et al. MIP-1alpha utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells. **Experimental Hematology**, v. 33, n. 3, p. 272-278, Mar. 2005.

OKAMATSU, Y. et al. MIP-1 gamma promotes receptor-activator-of-NF-kappa-B-ligand-induced osteoclast formation and survival. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 3, p. 2084-2090, Aug. 2004.

PAMMER, J. et al. Expression of regulatory apoptotic proteins in peripheral giant cell granulomas and lesions containing osteoclast-like giant cells. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.27, n. 6, p.267-271, Jul. 1998.

ROLLINS, B.J. Chemokines. **Blood**, v. 90, n. 3, p. 909-928, Aug. 1997.

RYU, O.H. et al. Gingival epithelial cell expression of macrophage inflammatory protein-1alpha induced by interleukin-1beta and lipopolysaccharide. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 8, p. 1627-1634, Aug. 2007.

SARAIVA, Adriana Machado. **Avaliação da expressão do receptor de quimiocina CCR5 nas lesões de células gigantes bucais**. 2008. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Belo Horizonte.

SCHALL, T.J.; BACON, K.B. Chemokines, leukocyte trafficking and inflammation. **Current Opinion in Immunology**, v.6, n. 6, p. 865-873, Dec. 1994.

SCHEVEN, B.A. Macrophage-inflammatory protein-1alpha regulates preosteoclast differentiation in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 254, n. 3, p. 773-778, Jan. 1999.

SHKLAR, G.; MEYER, I. Giant-cell tumors of the mandible and maxilla. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology**, v. 14, p. 809-827, 1961.

SIDHU, M.S.; PARKASH, H.; SIDHU, S.S. Central giant cell granuloma of jaws - review of 19 cases. **British Journal Of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.33, n. 1, p.43-46, Feb. 1995.

SILVA, T.A. et al. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 5, p. 310-316, Oct. 2005.

SILVA, T.A. et al. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 4, p. 306-319, Apr. 2007.

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

SOUZA, Paulo Eduardo Alencar de et al. Systemic leukocyte activation in patients with central giant cell lesions. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.34, n. 5, p.312-317, May. 2005.

SYRIO, Nárriman-Fátima-Lima et al. IL-10 and IL-10 receptor overexpression in oral giant cell lesions. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 16, n. 4, p. 488-492, Jul. 2011.

TADDEI, S.R. et al. Role of CCR2 in orthodontic tooth movement. **American Journal of Orthodontics Dentofacial Orthopedics**, v. 141, n. 2, p. 153-160, Feb. 2012.

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

TOH, K. et al. Possible involvement of MIP-1alpha in the recruitment of osteoclast progenitors to the distal tibia in rats with adjuvant-induced arthritis. **Laboratory Investigation**, v. 84, n. 9, p. 1092-1102, Sep. 2004.

VADDI, K.; NEWTON, R.C. Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. **Journal of Immunology**, v. 153, n. 10, p. 4721-4732, Nov. 1994.

WALDRON, C.A.; SHAFER, W.G. The central giant cell reparative granuloma of the jaws. An analysis of 38 cases. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.437-447, Apr. 1966.

WATANABE, T. et al. Direct stimulation of osteoclastogenesis by MIP-1alpha: evidence obtained from studies using RAW264 cell clone highly responsive to RANKL. **Journal of Endocrinology**, v. 180, n. 1, p. 193-201, Jan. 2004.

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

ZHENG, M.H. et al. Gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 in giant cell tumors of bone osteoclastoma: possible involvement in CD68+ macrophage-like cell migration. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 70, n.1, p. 121-129, Jul. 1998.