

**RAPHAELA ALVARENGA BRAGA DE FREITAS**

**CARACTERIZAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS  
MONONUCLEARES DOS GRANULOMAS CENTRAIS DE CÉLULAS  
GIGANTES DOS MAXILARES**

**Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2022**

Raphaella Alvarenga Braga de Freitas

**CARACTERIZAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS  
MONONUCLEARES DOS GRANULOMAS CENTRAIS DE CÉLULAS  
GIGANTES DOS MAXILARES**

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia – área de concentração em Patologia Bucal.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Cavaliéri Gomes.

**Coorientadora:** Prof. Dr<sup>a</sup>. Lucyene Miguita Luiz

Belo Horizonte  
2022

## Ficha Catalográfica

F866c Freitas, Raphaela Alvarenga Braga de.  
2022 Caracterização das subpopulações de células  
T mononucleares dos granulomas centrais de células gigantes  
dos maxilares / Raphaela Alvarenga Braga de Freitas. --  
2022.

48 f. : il.

Orientadora: Carolina Cavaliéri Gomes.

Coorientadora: Lucyene Miguita Luiz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Granuloma de células gigantes. 2. Células gigantes. 3. Osteoclastos. 4. Citometria de fluxo. 5. Células-tronco mesenquimais. I. Gomes, Carolina Cavaliéri. II. Luiz, Lucyene Miguita. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DA UFMG

### FOLHA DE APROVAÇÃO

#### CARACTERIZAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS MONONUCLEARES DOS GRANULOMAS CENTRAIS DE CÉLULAS GIGANTES DOS MAXILARES

**RAPHAELA ALVARENGA BRAGA DE FREITAS**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA BUCAL.

Aprovada em 07 de julho de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes - Orientador  
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Lucylene Miguita Luiz  
UFMG

Prof(a). Elisa Carvalho de Siqueira  
Centro Universitário Una

Prof(a). Vanessa de Fátima Bernardes  
UFMG

Belo Horizonte, 7 de julho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Cavalieri Gomes**, Professora do **Magistério Superior**, em 07/07/2022, às 10:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elisa Carvalho de Siqueira**, Usuária Externa, em 07/07/2022, às 10:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucylene Miguita Luiz**, Usuário Externo, em 07/07/2022, às 10:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa de Fátima Bernardes**, Professora do **Magistério Superior**, em 07/07/2022, às 10:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_confere&ui\\_session\\_esterno=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_confere&ui_session_esterno=0) informando o código verificador 1559474 e o código CRC A9D411A.

Dedico este trabalho a Deus, minha fonte diária de força e perseverança, que me encoraja a seguir em frente e a realizar meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, que me sustentou até aqui, não me deixou desistir e por me honrar todos os dias.

Agradeço aos meus pais, Rose e Reinaldo, pela criação que eu tive, por me ensinarem a ser forte, por todo amor e apoio. Agradeço também à minha avó Terezinha, o sol da minha vida, por todo amor e carinho.

Agradeço a todos os meus amigos, pela paciência, pelas conversas, por me motivarem a continuar, por confiarem em mim quando eu mesma já tinha desistido, principalmente ao Lucas, à Débora e ao Caio, obrigada, de coração.

Agradeço à minha orientadora, professora Carolina Cavaliéri Gomes, por ter deixado as portas abertas para o meu retorno à instituição, por me acolher tão bem no laboratório e por confiar que eu era capaz. À minha co-orientadora, professora Lucyene Miguita Luiz, pelos inúmeros ensinamentos, pelo cuidado diário e por me acompanhar durante todo o processo.

Agradeço aos parceiros do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (ICB-UFMG), na pessoa da professora Luciana Oliveira Andrade, por possibilitar a realização dos experimentos envolvendo o cultivo celular. Agradeço também ao Laboratório de Citometria de Fluxo (ICB-UFMG) pelo fornecimento do equipamento e suporte técnico, em especial à técnica Daniela Reis, pela disponibilidade e assistência. Agradeço ainda, a professora Walderez Ornelas Dutra, por ceder alíquotas de anticorpo para realização dos experimentos.

Agradeço por todos os laços de amizade construídos ou fortalecidos na pós-graduação, especialmente às colegas Juliana Cristina de Souza e Ana Carolina Pondé, que tornaram a caminhada mais leve e alegre.

Finalmente, agradeço à Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de pós-graduação (Processo nº 88887.602980/2021-00 do Programa PROEX).

A todos que, de alguma forma, estiveram comigo e contribuíram para minha formação, meu muito obrigada.

“Não vos inquieteis, pois, pelo dia de amanhã; porque o dia de amanhã cuidará de si mesmo. Basta a cada dia o seu mal.”

Mateus 6:34.

## RESUMO

O granuloma central de células gigantes (GCCG) dos maxilares é uma lesão intraóssea benigna, que pode apresentar um curso localmente agressivo. Setenta por cento dessas lesões apresentam mutações em *TRPV4*, *KRAS* ou *FGFR1*. Alguns estudos apontam que a população de células mononucleares parece ser o componente proliferativo da lesão. Essa população de células mononucleares é uma população mista, composta tanto por células mononucleares de origem monocítica quanto por células mesenquimais indiferenciadas. Assim, este estudo avaliou se, quando colocadas em cultura, o componente proliferativo da lesão é composto por células de origem mesenquimais ou de natureza monocítica. Foi estabelecida a cultura de células primárias de GCCG, a partir de uma amostra de conveniência composta por uma linhagem oriunda de uma lesão em mandíbula em paciente do sexo masculino, 20 anos. E, as amostras foram incubadas com os anticorpos CD14 e CD51/CD61, e triplicadas amostrais foram submetidas a citometria de fluxo para identificação das subpopulações de células presentes. Foi observado que somente as células mononucleares permaneciam ao longo das passagens. Pela citometria de fluxo, observou-se predominância de células CD14<sup>-</sup>CD51<sup>-</sup>CD61<sup>-</sup> triplamente negativas, compatível com o perfil esperado para células estromais/mesenquimais. Com base nos resultados, reforça-se a ideia de que as células mononucleares CD14<sup>-</sup>CD51<sup>-</sup>CD61<sup>-</sup> são centrais na patogênese dos GCCG, enquanto as células mononucleares de origem monocítica (CD14<sup>+</sup>) e as células gigantes semelhantes a osteoclastos (CD51<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>) são reativas.

**Palavras-Chave:** Granuloma de células gigantes. Células gigantes. Células mesenquimais. Osteoclastos. Citometria de fluxo.

## ABSTRACT

### Characterization of mononuclear cell subpopulations of central giant cell granulomas of the jaws

Central giant cell granuloma (CGCG) of the jaws is a benign intraosseous lesion, which may present an aggressive course. Seventy per cent of these lesions present mutations in *TRPV4*, *KRAS* or *FGFR1*. The population of mononuclear cells seems to be the proliferative component of the lesion. This mononuclear cell population is a mixed population, composed of both mononuclear cells of monocytic origin and undifferentiated mesenchymal cells. Thus, this study evaluated whether, when placed in culture, the proliferative component of (CGCG) is composed of mesenchymal cells or monocytic cells. The culture of primary CGCG cells was established from a convenience sample composed of a lineage originated from a mandibular lesion in 20 y.o. male patient. The samples were incubated with CD14 and CD51/CD61 antibodies, and triplicate samples were submitted to flow cytometry to identify the subpopulations of cells. It was observed that only mononuclear cells remained along the passages. By flow cytometry, a predominance of triple negative CD14<sup>-</sup>CD51<sup>-</sup>CD61<sup>-</sup> cells was observed, compatible with the expected profile for stromal/mesenchymal cells. Our results reinforce the idea that the mesenchymal cells (CD14<sup>-</sup>CD51<sup>-</sup>CD61<sup>-</sup>) have central importance in the CGCG pathogenesis, while the mononuclear cells of monocytic origin (CD14<sup>+</sup>) and the osteoclast-like giant cells (CD51<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>) are reactive.

**Keywords:** Giant cell granuloma. Giant cells. Mesenchymal cells. Osteoclasts. Flow cytometry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fragmentos do granuloma central de células gigantes dos maxilares para técnica do explante.....	19
Figura 2 - Fotomicrografia do granuloma central de células gigantes dos maxilares .....	21
Figura 3 - Cultura primária de células derivadas do granuloma central de células gigantes dos maxilares a partir da técnica do explante.....	22
Figura 4 - Células derivadas do granuloma central de células gigantes dos maxilares atingindo a confluência no cultivo na passagem 0 .....	22
Figura 5 - Número de células CD14 e CD51/CD61 dos granulomas centrais de células gigantes dos maxilares na passagem 1.....	24
Figura 6 - Número de células CD14 e CD51/CD61 dos granulomas centrais de células gigantes dos maxilares na passagem 2.....	25
Figura 7 - Número de células CD14 e CD51/CD61 dos granulomas centrais de células gigantes dos maxilares na passagem 7.....	26
Figura 8 - Perfil das células do granuloma central de células gigantes dos maxilares em diferentes passagens.....	27

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
2.1 Granuloma central de células gigantes dos maxilares.....	13
2.2 Heterogeneidade das populações celulares encontradas nos granulomas centrais de células gigantes dos maxilares.....	14
2.2.1 Células gigantes multinucleadas.....	14
2.2.2 Subpopulações de células mononucleares.....	15
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	18
4.1 Aspectos éticos e amostras.....	18
4.2 Cultura primária de células do granuloma central de células gigantes dos maxilares.....	18
4.3 Análise de células do granuloma central de células gigantes dos maxilares por citometria de fluxo.....	19
4.4 Análise estatística dos dados.....	20
<b>5 RESULTADOS</b> .....	21
5.1 Caracterização da amostra.....	21
5.2 Cultivo de células derivadas do granuloma central de células gigantes dos maxilares.....	21
5.3 Perfil de células do granuloma central de células gigantes dos maxilares em diferentes passagens.....	23
5.4 Comparando o perfil de células de GCCG em diferentes passagens.....	26
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	28

<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	30
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31
<b>APÊNDICE A</b> - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.....	35
<b>APÊNDICE B</b> – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) destinado a maiores de 18 anos de idade.....	36
<b>APÊNDICE C</b> – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) destinado a pais de menores de 18 anos de idade.....	40
<b>APÊNDICE D</b> – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido para menores (TALE).....	44
<b>APÊNDICE E</b> – Controle FITC e PE no Flowing Software 2.5.1.....	47
<b>APÊNDICE F</b> – Primeira página do artigo publicado no periódico <i>Journal of Oral Pathology and Medicine</i> com os resultados do estudo .....	48

## 1 INTRODUÇÃO

Os granulomas centrais de células gigantes dos maxilares (GCCG) são lesões benignas e osteolíticas que afetam principalmente indivíduos jovens. Estas lesões podem se apresentar como achados em exames radiográficos odontológicos de rotina ou como aumento de volume indolor ou não. Os GCCG podem ter curso clínico indolente ou se comportar de forma agressiva, e o diagnóstico é estabelecido através da correlação clínico-patológica. Os GCCG ocorrem frequentemente de forma esporádica, mas lesões semelhantes podem integrar síndromes genéticas como o querubismo, a síndrome Noonan, neurofibromatose tipo 1, ou condições sistêmicas como o hiperparatireoidismo (GOMES *et al.*, 2020; GUIMARÃES *et al.*, 2021).

Os GCCG são caracterizados histologicamente pela presença de células gigantes multinucleadas semelhantes a osteoclastos e células mononucleares ovoides ou fusiformes, arrançadas em um estroma fibroso vascularizado. É possível ainda, notar áreas de hemorragia e depósitos de hemossiderina (EL-NAGGAR, *et al.*, 2017).

Microscopicamente, é possível observar nos GCCG duas populações distintas de células: células gigantes multinucleadas e uma população de células mononucleares mistas. As células gigantes possuem fenótipo osteoclástico. Dentre as células mononucleares é possível observar células de origem monocítica com imunofenótipo similar a macrófagos (CD14<sup>+</sup>), e células precursoras de osteoclastos, além de células de origem mesenquimal. E, embora se saiba que estas células mononucleares possam ser de origem monocítica ou mesenquimal, o componente proliferativo dessas lesões ainda não está bem caracterizado (BROOKS; GLOGAUER; MCCULLOCH, 2019).

Neste sentido, a cultura celular parece ser um bom modelo auxiliar na caracterização dessas células. Itonaga e colaboradores (2003), por meio de cultura primária de GCCG, identificaram um subconjunto de células altamente proliferativo, não-positivas para marcadores de osteoclastos e seus precursores, que são as células de origem mesenquimal.

No tumor de células gigantes dos ossos longos, entidade extragnática que compartilha similaridades histológicas com a GCCG, as células mononucleares estromais representam o componente neoplásico, enquanto as células gigantes

multinucleadas e suas precursoras correspondem ao componente reativo deste tumor (WÜLLING; DELLING; KAISER, 2003; FLANAGAN *et al.*, 1988; BEHJATI *et al.*, 2013). Da mesma forma, no fibroma não-ossificante dos ossos longos, outra mímica microscópica do GCCG, a fração de células neoplásicas corresponde a células mononucleares (BAUMHOER *et al.*, 2019).

O presente estudo teve como objetivo verificar se, em cultura primária de células derivadas de GCCG humanas, o componente proliferativo da lesão é composto por células mononucleares mesenquimais ou de natureza monocítica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Granuloma central de células gigantes dos maxilares

O granuloma central de células gigantes, é uma lesão intraóssea osteolítica benigna, que afeta principalmente indivíduos abaixo dos 30 anos de idade. O GCCG acomete tanto maxila, quanto mandíbula, sendo a região anterior de mandíbula o sítio de maior prevalência (CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018).

O comportamento clínico dos GCCG é variável, podendo apresentar desde um crescimento lento e assintomático, a lesões acompanhadas de dor ou parestesia. Radiograficamente, os achados são diversos, variando de pequenas lesões uniloculares a lesões multiloculares de grandes extensões, com limites mal definidos, causando grande destruição óssea local, reabsorção e/ou deslocamento de dentes (TRANTAFILLIDOU *et al.*, 2011; FLANAGAN; SPEIGHT, 2014).

O GCCG foi anteriormente considerado como um granuloma reparador dos ossos maxilares, devido ao seu comportamento menos agressivo, quando comparado a tumores que afetam ossos extragnáticos. Entretanto, sabe-se que existem casos de GCCG que apresentam crescimento rápido e maior, agressividade local. Sendo assim, é possível que algumas lesões mais agressivas possam sugerir uma origem neoplásica, mas lesões de comportamento indolente são possivelmente lesões proliferativas não-neoplásicas ou reacionais (GOMES *et al.*, 2020).

Os GCCG são caracterizados microscopicamente pela proliferação de células mononucleares ovoides ou fusiformes com a presença de quantidade variável de células gigantes multinucleadas, semelhantes a osteoclastos, dispostas em um rico fundo vascular hemorrágico, com ocasionais trabéculas de tecido ósseo (EL-NAGGAR, *et al.*, 2017).

Lesões ricas em osteoclastos com semelhanças histológicas ao GCCG incluem o tumor de células gigantes dos ossos longos, o fibroma não-ossificante, o condroblastoma, dentre outros (GOMES *et al.*, 2020; EDWARDS, 2015; BEHJATI, *et al.*, 2013). Behjati *et al* (2013) identificaram mutações no gene *H3F3A* em 92% dos tumores de células gigantes dos ossos longos. Essas mutações, são restritas às células mononucleares com ausência de imunorreatividade para marcadores osteoclásticos (CD14<sup>+</sup>CD51<sup>+</sup>CD61<sup>-</sup>). Entretanto, mutações no gene *H3F3A* estão

ausentes nas lesões centrais de células gigantes dos maxilares, que são características de lesões extragnáticas. Dessa maneira, essas mutações parecem ser um importante marcador genético na distinção entre essas entidades (GOMES *et al.*, 2014). Todavia, um estudo realizou o sequenciamento de 37 amostras de GCCG esporádicos e relatou a presença de mutações somáticas, heterozigóticas de ganho de função em *KRAS*, *FGFR1* e *TRPV4*, sendo que as mutações *TRPV4* p.M713V/I são exclusivas de GCCG (GOMES *et al.*, 2018).

Diferentes abordagens terapêuticas para o tratamento dessas lesões já foram descritas. Apesar da excisão cirúrgica ser o padrão ouro no tratamento, autores relataram o uso de distintas técnicas cirúrgicas (curetagem, enucleação, ressecção marginal) associadas ou não a terapias alternativas, como injeção intralesional de medicações como calcitonina, corticoesteroides, interferon, anticorpo monoclonal ou bisfosfonatos (LANGE; AKKER; BERG, 2007; CHRCANOVIC, GOMES, GOMEZ, 2018; RICHARDSON *et al.*, 2021; CAMARINI & TOLENTINO, 2022). Chrcanovic e colaboradores (2019) sugerem que lesões cujas características clínicas se associavam a maior agressividade (deslocamento dentário e reabsorção radicular) e foram tratadas com curetagem tiveram uma chance mais significativa de recidivas. Ademais, uma revisão sistemática contendo 2270 casos de granulomas centrais de células gigantes acometendo ossos maxilares, foi capaz de afirmar que o melhor protocolo para o manejo dessas lesões ainda não foi determinado (CHRCANOVIC, GOMES, GOMEZ, 2018).

## 2.2 Heterogeneidade das populações celulares encontradas nos granulomas centrais de células gigantes dos maxilares

### 2.2.1 Células gigantes multinucleadas

As células gigantes multinucleadas presentes nos GCCG exibem imunofenótipo àquele expresso por osteoclastos, mas não por seus precursores ou para anticorpos que reagem com macrófagos (EL-MOFTY & OSDOBY, 1985; FLANAGAN *et al.*, 1988; BONETTI *et al.*, 1990; LIU; YU; LI, 2003). Células com fenótipo osteoclástico e seus precursores são imunorreativos para CD51/CD61 e CD14, respectivamente, assim como para CD45 e CD68 (BROOKS, GLOGAUER, MCCULLOCH, 2019).

CD51/CD61 é um complexo de integrina, também conhecido como receptor de adesão integrina  $\alpha\beta 3$  e foi identificado como um marcador de tecido vascular angiogênico. Embora seja minimamente expresso em células endoteliais normais em repouso, o marcador de superfície CD51/CD61 é regulado positivamente em células endoteliais de vasos sanguíneos neoformados dentro de tumores humanos (BROOKS; CLARK; CHERESH, 1994; BOER *et al.*, 2020). Sugere-se que esta integrina desempenhe um papel relevante na adesão dos osteoclastos à matriz óssea (BOER *et al.*, 2020; TAKADA; YE; SIMON, 2007; DUONG *et al.*, 2000; FENG & TEITELBAUM, 2013).

Estudos envolvendo cultura de células puderam evidenciar que células gigantes e as células semelhantes a macrófagos sobreviveram a poucas passagens, enquanto as células mononucleares fusiformes continuaram a proliferar. Isso reforça o fato de que as células mononucleares são o componente proliferativo da lesão (EL-MOFTY & OSDOBY, 1985; ITONAGA *et al.*, 2003).

### 2.2.2 Subpopulações de células mononucleares

Já foi demonstrado que as células gigantes não apresentam atividade proliferativa e apresentam perfil apoptótico (SOUZA; MESQUITA; GOMES, 2000; AMARAL *et al.*, 2011). As células mononucleares são o componente proliferativo dos GCCG, conforme demonstrado pela expressão dos marcadores Ki-67 e PCNA (ITONAGA *et al.*, 2003; SOUZA; MESQUITA; GOMES, 2000). Ademais, estas células mononucleares compõem uma população heterogênea, formada por um grupo de células precursoras de osteoclastos e outro grupo de células mesenquimais (EL-MOFTY & OSDOBY, 1985; ITONAGA *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2020).

Como já foi mencionado anteriormente, células mononucleares precursoras de osteoclastos expressam CD14, sendo este descrito como antígeno de diferenciação de monócitos/ macrófagos na superfície da linhagem mieloide, como monócitos, macrófagos e células dendríticas (LANDMANN; MULLER; ZIMMERLI, 2000; ZAMANI *et al.*, 2013).

Por meio do cultivo celular e reação em cadeia polimerase (PCR) em amostras de cisto ósseo aneurismático, foi demonstrado que as células estromais mononucleares CD14<sup>+</sup> expressam fatores osteoclastogênicos e muito provavelmente

interagem com as células CD14<sup>+</sup> para formar células gigantes semelhantes a osteoclastos por um mecanismo dependente de RANKL (TAYLOR *et al.*, 2012).

Itonaga e colaboradores (2003) sugeriram que o componente proliferativo do GCCG é composto por células mononucleares estromais de origem mesenquimal. Estas células teriam a capacidade de se diferenciarem em linhagem fibroblástica/osteoblástica. Utilizando cultura de células, este estudo demonstrou, ainda, que estas células estromais mesenquimais expressam RANKL e são capazes de induzir a formação de osteoclastos a partir de monócitos humanos (ITONAGA, *et al.*, 2003). Outros estudos também sugeriram que eventos envolvidos na formação de osteoclastos além de serem regulados por um grande número de citocinas, parece haver ativação de monócitos pelo fator estimulador de colônia de macrófagos, que estimula a expressão de RANK na superfície celular, sendo que RANKL, pode ser expresso por osteoblastos, células do estroma e células T (BROOKS; GLOGAUER; MCCULLOCH, 2019; SCHREUDER *et al.*, 2021).

Pouco se sabe sobre as características fenotípicas destas células mononucleares de origem mesenquimal. Aparentemente, com base em estudos prévios estas são as células que compõem a população de células estromais, que é o componente proliferativo dos GCCG dos maxilares. No entanto, há pouca evidência que comprove se, de fato, as células mononucleares derivadas dos GCCG que proliferam em cultura são as de origem mesenquimal. Assim, visamos no presente trabalho, verificar se a fração proliferativa dos GCCG é composta por células mesenquimais ou de natureza monocítica, a partir da cultura primária de células derivadas de GCCG.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Caracterizar a natureza da subpopulação de células mononucleares em cultura celular derivada do granuloma central de células gigantes dos maxilares.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Verificar por citometria de fluxo em cultura de células derivadas de granulomas centrais de células gigantes a proporção de células mononucleares de provável natureza monocítica/osteoclástica (CD14<sup>+</sup>CD51<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>).
- Verificar por citometria de fluxo em cultura de células derivadas de granulomas centrais de células gigantes a proporção de células mononucleares de provável origem mesenquimal (CD14<sup>-</sup>CD51<sup>-</sup>CD61<sup>-</sup>).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Aspectos éticos e amostras

Este estudo é parte de um projeto submetido e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG) sob registro CAAE nº 24763719.4.0000.5149, parecer nº4.582.151 (Apêndice A). Foi utilizada uma amostra de conveniência de granulomas centrais de células gigantes esporádicas dos ossos maxilares, sem associação com hiperparatiroidismo, querubismo ou a qualquer outra síndrome. A amostra foi coletada na clínica da disciplina de Patologia, Estomatologia e Radiologia II da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Apêndice B e Apêndice C), destinado aos participantes maiores de idade e pais de menores de idade e Termo de Assentimento Livre Esclarecido (TALE, Apêndice D) aplicado aos menores de idade que concordaram em participar do estudo. A amostra utilizada nos experimentos deste trabalho foi originária de uma lesão em mandíbula, referente a única linhagem proveniente do indivíduo LCCG5, 20 anos. A amostra foi testada e revelou perfil genético *wild-type* para as mutações em *TRPV4*, *KRAS* e *FGFR1*.

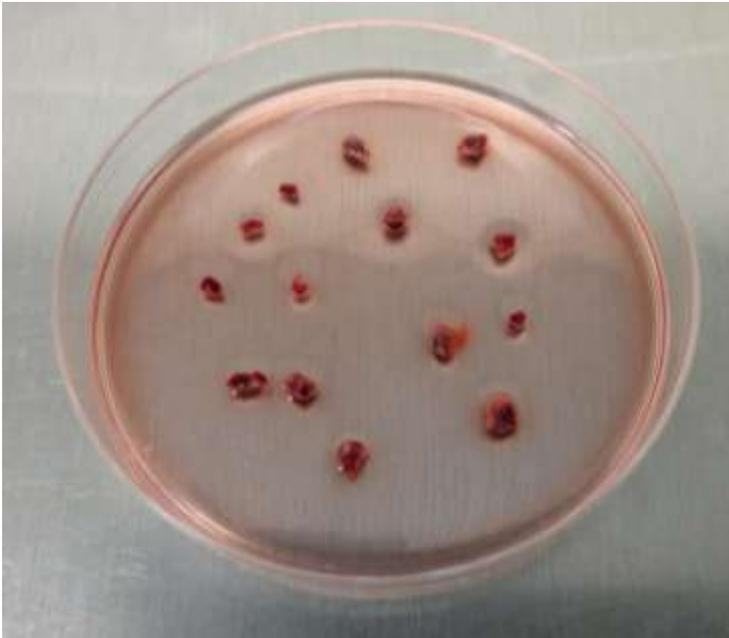
### 4.2 Cultura primária de células do granuloma central de células gigantes dos maxilares

A cultura primária foi obtida pela técnica de explante. O tecido coletado foi transportado em meio Dulbecco essencial modificado (DMEM, Cat. #12100046, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cat. #12657029, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e 2% de solução antibiótica-antimicótica (Cat. # A5955, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

Em laboratório, o tecido foi seccionado em fragmentos de aproximadamente 1-2 mm e foram lavados em solução salina tamponada 1x (PBS, Cat. #70011044, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) contendo 2% de solução antibiótica-antimicótica, conforme observado na Figura 1. Em seguida, os fragmentos foram semeados em placas de petri de 100 mm com o meio de cultura. Neste momento, o meio de cultivo foi constituído de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de solução

antibiótica-antimicótica. O meio foi trocado após o 5º dia, seguido por trocas do meio a cada 2-3 dias até obter a subconfluência de 80-90%. Após a obtenção da subconfluência desejada, as células foram subcultivadas na densidade de  $10^5$  células por  $\text{cm}^2$ , sendo mantidas a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera umidificada com 5% de  $\text{CO}_2$  e trocas de meio a cada 2-3 dias, até atingirem a passagem 1 (P1), a passagem 2 (P2) e a passagem 7 (P7) para análises de citometria de fluxo. A escolha das passagens foi baseada em estudos prévios do grupo.

Figura 1 – Fragmentos dos granulomas centrais de células gigantes dos maxilares para técnica do explante



Fonte: próprio autor (2021).

#### 4.3 Análise de células do granuloma central de células gigantes dos maxilares por citometria de fluxo

Foram analisadas células em diferentes passagens (P1, P2, P7) a partir de  $2,0 \times 10^5$  células por amostra. Inicialmente, as células foram lavadas com PBS 1X contendo 1% solução antibiótica-antimicótica e centrifugadas por 5 minutos a  $250g$  a fim de remover excesso do meio de cultura.

Para a caracterização de células derivadas de GCCG através da citometria de fluxo, foram utilizados os marcadores moleculares CD14 (anticorpo monoclonal, conjugado-FITC, 1:100, clone 61D3, #11-0149-42, eBioscience™) e CD51/CD61

(anticorpo monoclonal, conjugado-PE, 1:100, clone 23C6 (RUO), Cat. #550037, BD Pharmingen), incubadas por um período de 1 hora. Decorrida 1 hora de incubação, a remoção de excesso de anticorpo foi efetuada utilizando 300 µL de isoton (Coulter Isoton III diluente, Cat. #8546733, Beckman Coulter, Brea, CA, EUA) seguida de centrifugação por 5 minutos a 250g. Após remoção do sobrenadante, foi feita ressuspensão das amostras em 300µL de isoton e efetuada a análise de triplicadas, utilizando o equipamento BD FACS Canto II (BD Biosciences) e aquisição de dados pelo software BD FACSDiva 6.1. (BD Biosciences) do Centro de Laboratórios Multiusuários (CELAM) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade federal de Minas Gerais.

Como controle positivo para compensação, “beads” ou esferas de 6µm de diâmetro (AbC™ Total Antibody Compensation Bead Kit, Life Technologies) foram utilizadas para cada anticorpo. Como controle negativo foram utilizadas as células derivadas do GCCG sem incubação dos anticorpos.

A interpretação dos dados obtidos a partir da citometria de fluxo nas células mononucleares do GCCG será de acordo com os seguintes critérios:

- a) células **CD14<sup>+</sup> e CD51<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>** = precursoras osteoclásticas
- b) células **CD14<sup>+</sup>** = natureza monocítica
- c) células **CD51<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>** = compatíveis com osteoclastos
- d) células **CD14<sup>-</sup> e CD51<sup>-</sup>CD61<sup>-</sup>** = células “estromais”

#### 4.4 Análise estatística dos dados

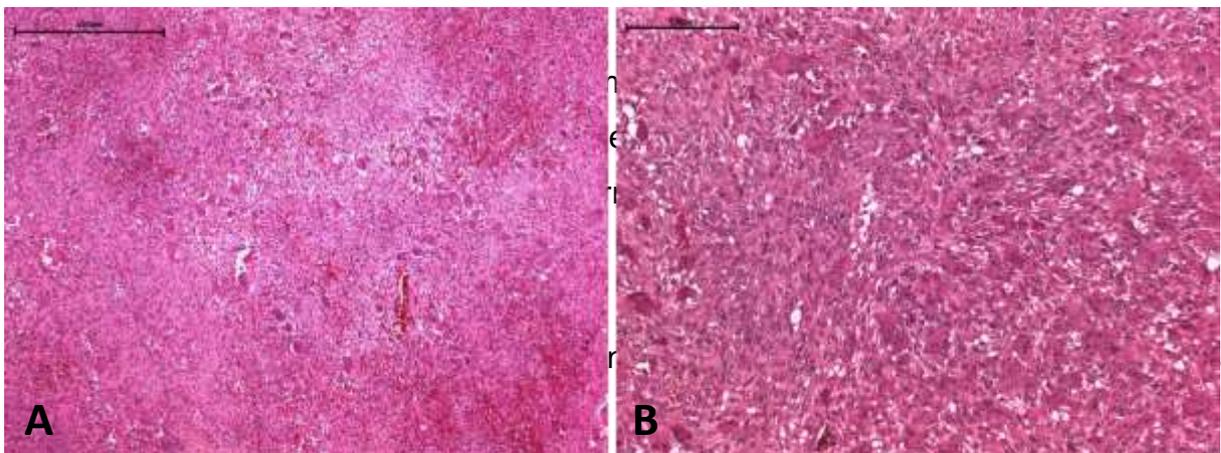
Os dados das triplicatas adquiridos no citômetro de fluxo foram transportados para o software de análise (Flowing Software 2.5.1 – Turku Bioscience, Turku, Finlândia) a fim de se obter dados quantitativos a respeito das subpopulações de células. Antes de iniciar a análise, foi realizado um controle para definir a localização dos eventos de interesse, com base nos respectivos marcadores, CD14 FITC ou CD51/CD61 PE (APÊNDICE E). As comparações entre cada grupo foram realizadas usando ANOVA1 seguida do teste de Tukey. A significância estatística foi estabelecida em  $\alpha \leq 0,05$ . Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização histológica da amostra

A amostra de GCCG utilizada neste estudo foi caracterizada histologicamente pela presença de células mononucleares fusiformes e ovoides, entremeadas por células gigantes multinucleadas (FIGURA 2).

Figura 2 – Fotomicrografia dos granulomas centrais de células gigantes dos maxilares



Fonte: próprio autor (2021).

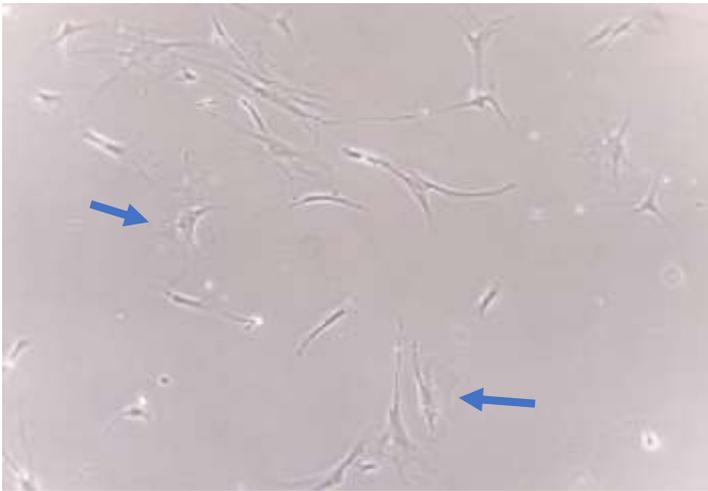
### 5.2 Cultivo de células derivadas do granuloma central de células gigantes dos maxilares

A cultura primária foi obtida pela técnica do explante. Foi observada proliferação de células com padrão morfológico homogêneo, composto por células mononucleares de aspecto estrelado/fusiforme, além de células gigantes multinucleadas nas passagens iniciais (FIGURA 3).

Observou-se que as células atingiam a subconfluência 80-90% cerca de 07 dias após o subcultivo (FIGURA 4) e, que quanto mais avançada a passagem, mais dias levava-se para a obtenção da subconfluência (acima de P10), o que nos faz crer que as células estavam entrando em senescência.

Em relação a manutenção do cultivo e a exaustão das células colocadas em cultura, foi possível observar células viáveis até a passagem 12.

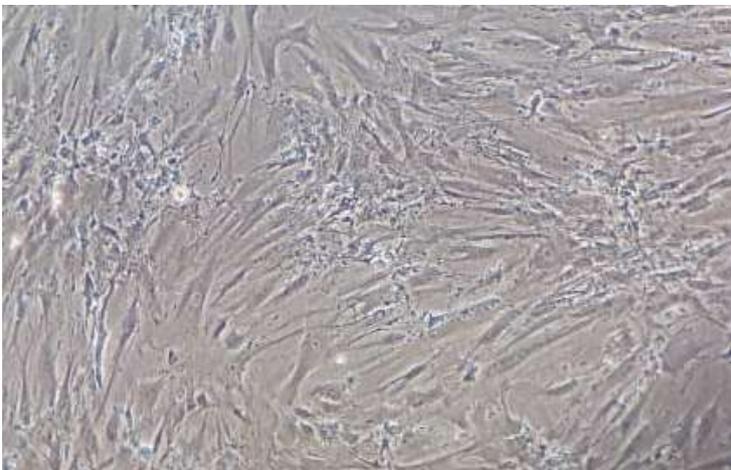
Figura 3 – Cultura primária de células derivadas do granuloma central de células gigantes dos maxilares a partir da técnica do explante na passagem 0



Fonte: próprio autor (2021).

Células derivadas do explante de GCCG. As setas representam células gigantes multinucleadas.

Figura 4 – Células derivadas de granuloma central de células gigantes dos maxilares atingindo a confluência no cultivo na passagem 0



Fonte: próprio autor (2021).

### 5.3 Perfil de células do granuloma central de células gigantes dos maxilares em diferentes passagens

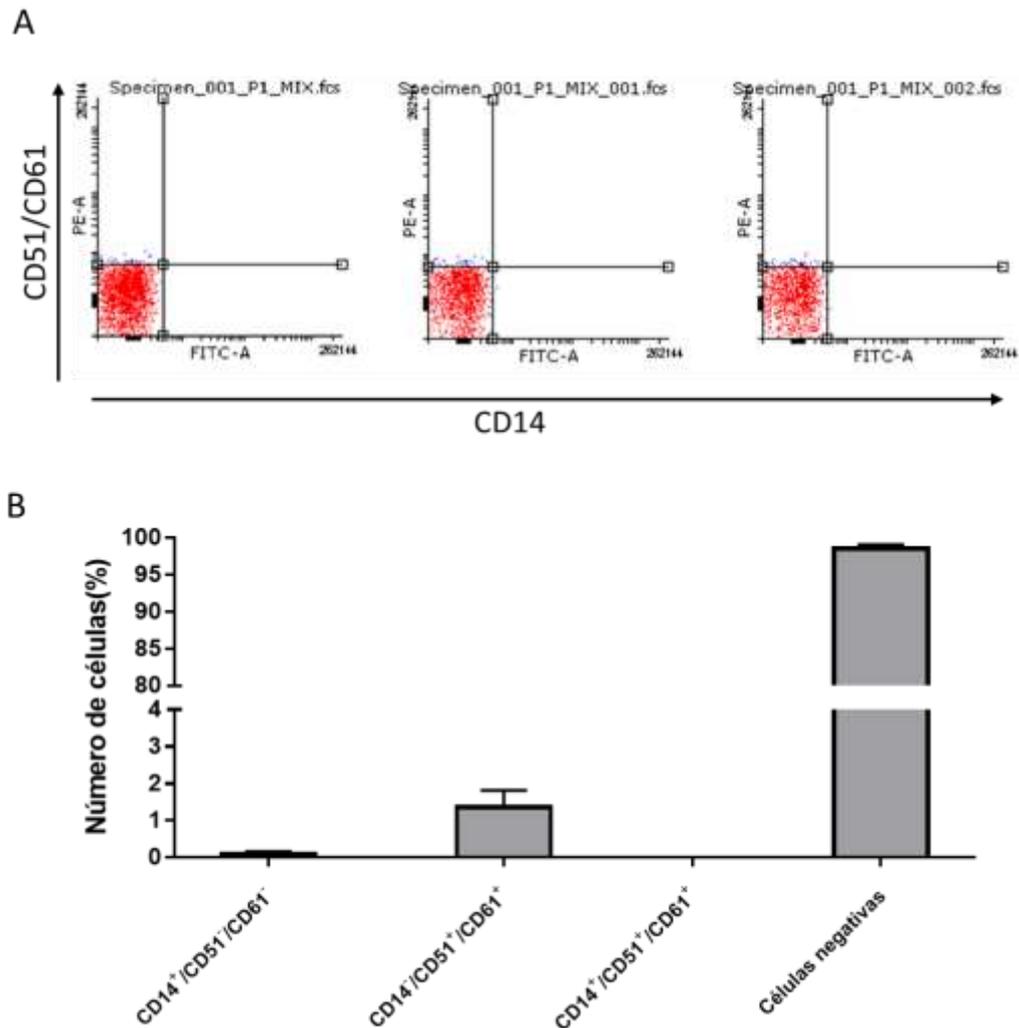
Para caracterizar as células derivadas de GCCG em células do tipo estromais, monocíticas ou osteoclásticas, foi utilizado o perfil de expressão de marcadores CD14 e CD51/CD61, por meio da análise por citometria de fluxo nas células em diferentes passagens.

Na passagem 1 (P1) (FIGURA 5) foi possível observar que  $0,1\pm 0,1\%$  correspondiam a células CD14<sup>+</sup>CD51<sup>-</sup>CD61<sup>-</sup>,  $1,4\pm 0,4\%$  a células CD14<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>, não havia células triplamente marcadas e  $98,6\pm 0,5\%$  eram negativas.

A Figura 6 apresenta os gráficos relacionados aos achados na passagem 2 (P2), dos quais  $0,3\pm 0,3\%$  correspondiam a células CD14<sup>+</sup>CD51<sup>-</sup>CD61<sup>-</sup>,  $2,4\pm 1,1\%$  a células CD14<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>, não havia células triplamente marcadas e  $97,4\pm 1,4\%$  foram negativas.

Nas amostras em passagem 7 (P7) observou-se que  $0,2\pm 0,1\%$  das células correspondiam a células CD14<sup>+</sup>CD51<sup>-</sup>CD61<sup>-</sup>,  $1,6\pm 0,3\%$  a células CD14<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>, não haviam células triplamente positivas e  $98,3\pm 0,2\%$  eram negativas para os marcadores (FIGURA 7).

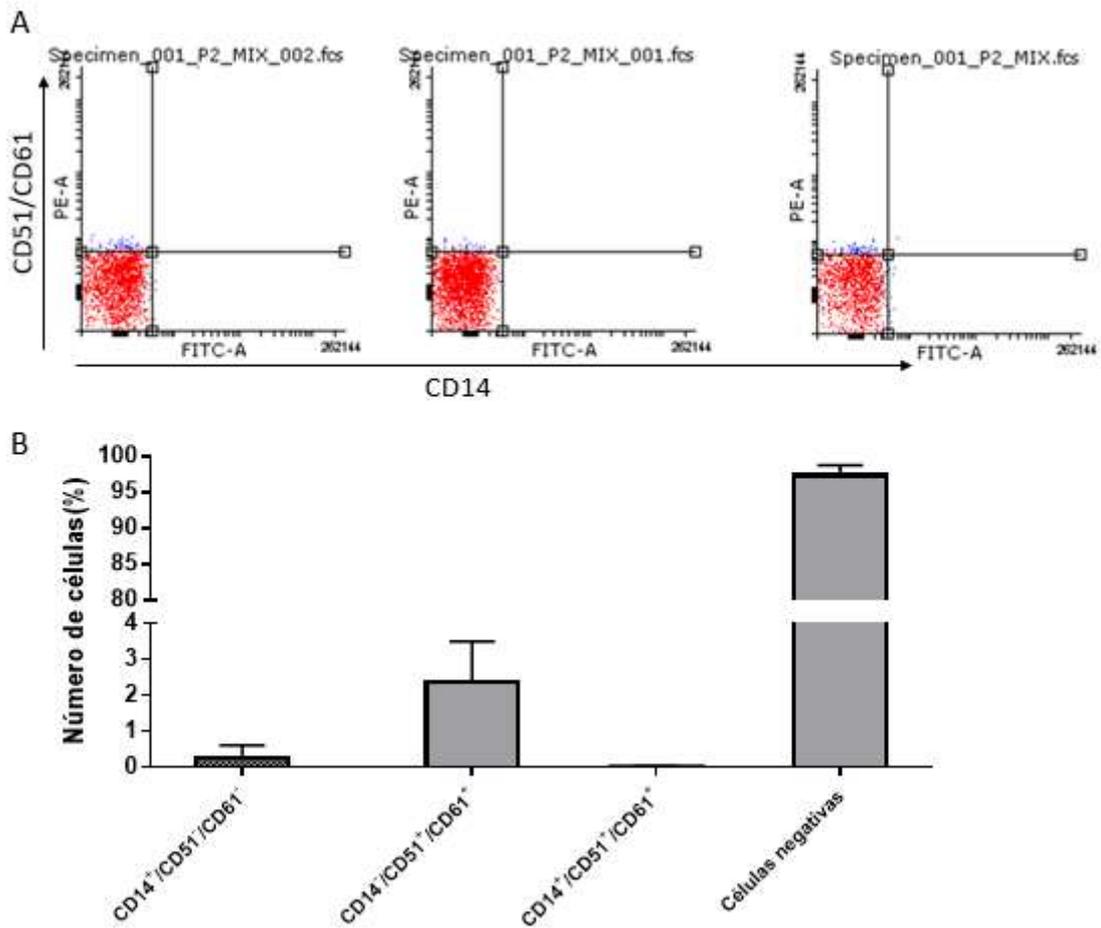
Figura 5 – Número de células CD14 e CD51/CD61 dos granulomas centrais de células gigantes dos maxilares na passagem 1



Fonte: próprio autor (2021).

A, *dotplots* das triplicatas amostrais de células derivadas de GCCG na Passagem 1 analisadas por citometria de fluxo. B, Porcentagem média do número de células expressando cada perfil de marcação para os marcadores CD14 e CD51/CD61.

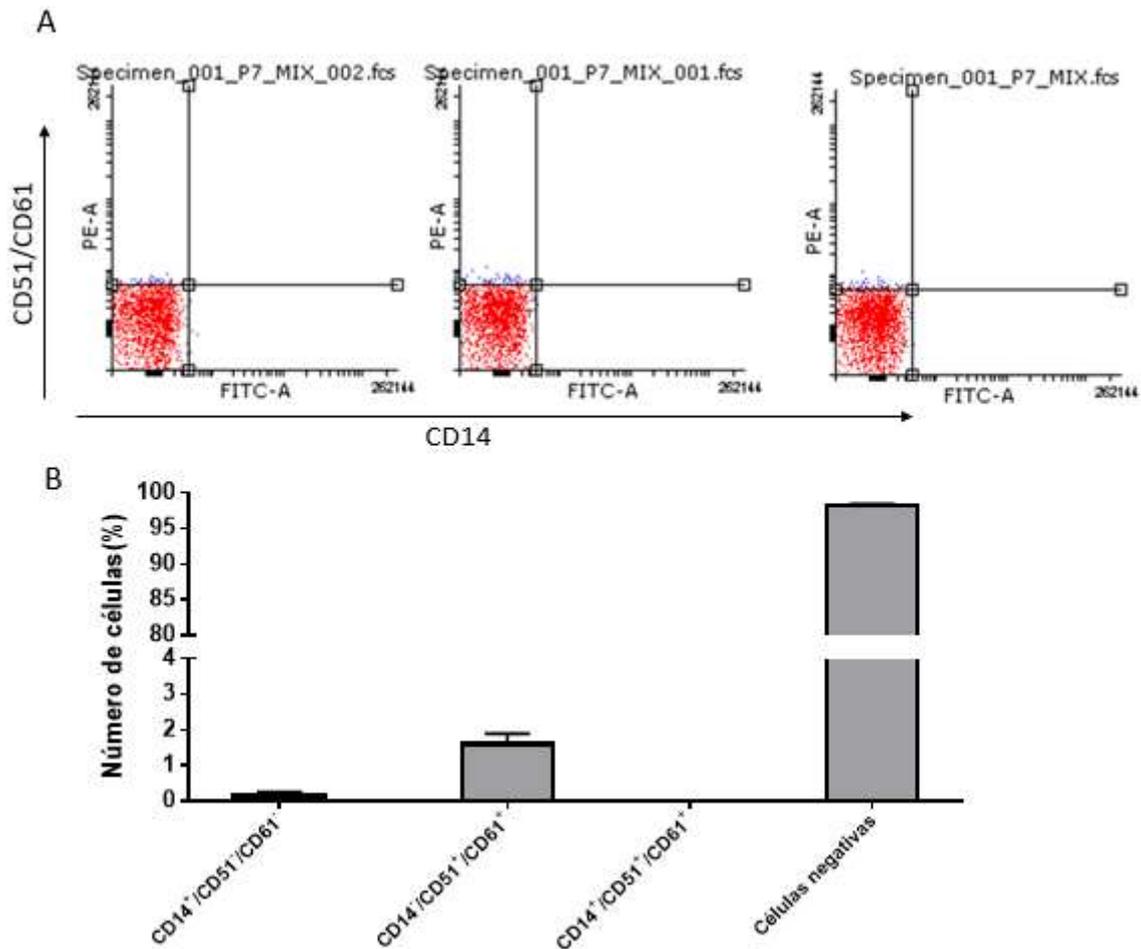
Figura 6 - Número de células CD14 e CD51/CD61 dos granulomas centrais de células gigantes dos maxilares na passagem 2



Fonte: próprio autor (2021).

A, *dotplots* das triplicatas amostrais de células derivadas de GCCG na Passagem 2 analisadas por citometria de fluxo. B, Porcentagem média do número de células expressando cada perfil de marcação para os marcadores CD14 e CD51/CD61.

Figura 7 - Número de células CD14 e CD51/CD61 de GCCG na passagem 7



Fonte: próprio autor (2021).

A, *dotplots* das triplicatas amostrais de células derivadas de GCCG na Passagem 7 analisadas por citometria de fluxo. B, Porcentagem média do número de células expressando cada perfil de marcação para os marcadores CD14 e CD51/CD61.

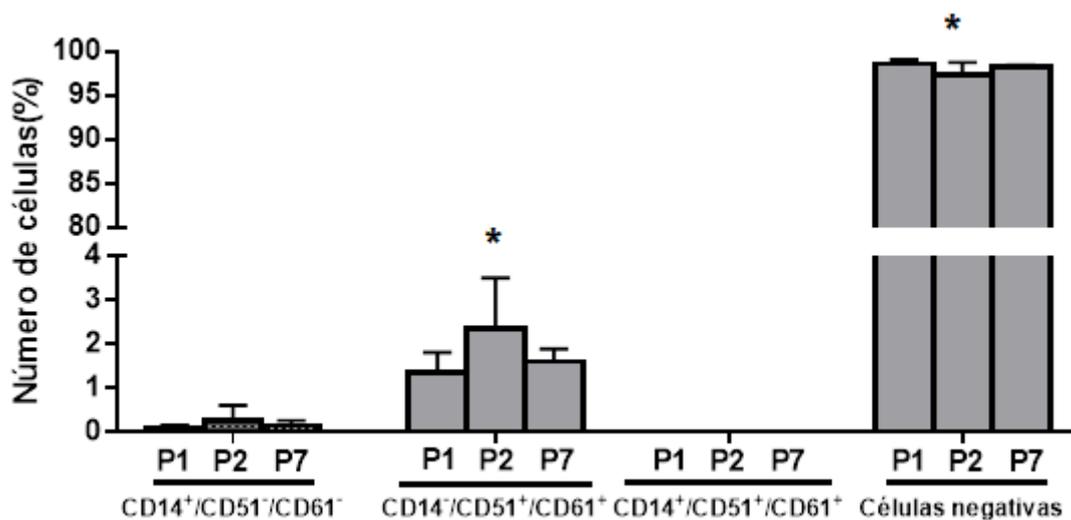
#### 5.4 Comparando o perfil de células de GCCG em cultura em diferentes passagens

Foi possível observar que as células do GCCG, em cultivo, mantiveram um perfil homogêneo onde as células “estromais” (CD14<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>) foram predominantes (98,1 ± 0,9%) e significativamente mais expressas do que as demais subpopulações ( $p < 0,0001$ , ANOVA *one-way* e teste de Tukey). Células compatíveis com osteoclastos (CD14<sup>+</sup>CD51<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>) foram observadas apenas em uma pequena proporção (1,8 ± 0,7%) mas foram estatisticamente significantes ( $p < 0,0001$ , ANOVA *one-way* e teste de Tukey) quando comparadas com as células positivas apenas para

CD14 ( $0,2 \pm 0,2\%$ ) ou às células triplamente positivas (0%), coerentes com células da linhagem monocítica e precursores osteoclásticos, respectivamente. Entretanto, quando comparadas as diferentes passagens (P1, P2 e P7), de acordo com cada tipo/perfil celular, não foi observada diferença significativa, isto é, apesar das diferentes passagens, a população mesenquimal se manteve inalterada. (FIGURA 8).

Adicionalmente, os resultados do presente trabalho foram incorporados em um artigo científico, aceito e publicado no periódico *Journal of Oral Pathology and Medicine* (APÊNDICE F).

Figura 8 – Perfil das células do granuloma central de células gigantes em diferentes passagens



Fonte: próprio autor (2021).

O gráfico mostra o perfil das células obtido através da citometria de fluxo do granuloma central de células gigantes dos maxilares, para CD14 e CD51/CD61. Nota-se um grande número de células negativas, pequeno número de células CD14<sup>+</sup>CD51<sup>-</sup>CD61<sup>-</sup> e CD14<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>, além da ausência de células triplamente positivas na linhagem celular estudada. (\*  $p < 0,0001$ , ANOVA one-way e Teste de Tukey)

## 6 DISCUSSÃO

O GCCG apesar de ser uma lesão benigna cujo comportamento, na maioria das vezes, é indolente, pode ser localmente agressivo em alguns casos, o que gera discussão em relação a sua origem reativa ou neoplásica (BROOKS, GLOGAUER, MCCULLOCH, 2019; GOMES *et al.*, 2020).

Os achados microscópicos de amostras de GCCG revelam que estas lesões são compostas por células mononucleares entremeadas por células gigantes multinucleadas, e que a população de células mononucleares é diversificada (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Dessa maneira, caracterizar a natureza da subpopulação de células mononucleares, a partir da cultura primária de células oriundas de GCCG, parece ser uma interessante abordagem, e o objetivo desse trabalho é expandir o entendimento no que diz respeito ao desenvolvimento dessas lesões.

Diversos estudos afirmam que a fração proliferativa dos GCCG é composta pelas células mononucleares de origem não monocítica (BROOKS; GLOGAUER; MCCULLOCH, 2019; ITONAGA *et al.* 2003, SOUZA; MESQUITA; GOMES, 2000). No presente estudo, células gigantes multinucleadas foram observadas até a 2ª passagem na cultura primária de células derivadas de GCCG e, a partir da 3ª passagem, apenas células mononucleares foram observadas. Estudos anteriores também relataram o desaparecimento de células multinucleadas semelhantes a osteoclastos na cultura de GCCG, juntamente com o crescimento contínuo das células mononucleares fusiformes (EL-MOFTY & OSDOPY, 1985; ITONAGA *et al.*, 2003).

Da mesma forma que foi observado em nossos resultados, Wülling, Delling & Kaiser (2003) relataram em seu trabalho que apenas as células mononucleares sobreviveram em cultura de células derivadas de tumores de células gigantes do osso. Ainda, através da cultura de células provenientes de granuloma de células gigantes de ossos da mão, autores observaram que as células semelhantes a macrófagos e as células gigantes não persistiram em cultura, o que sugere que o componente proliferativo desses tumores seria uma célula mesenquimal com capacidade de se diferenciar em linhagem fibroblástica/osteoblástica (ITONAGA *et al.*, 2002).

No tumor de células gigantes dos ossos longos, as células proliferativas são CD14<sup>+</sup>CD51<sup>+</sup>CD61<sup>-</sup> (BEHJATI *et al.*, 2013), e de forma similar, a maioria das células de GCCG isoladas no presente trabalho também eram células mononucleares com formato fusiforme e perfil de expressão CD14<sup>+</sup>CD51<sup>+</sup>CD61<sup>-</sup>. Esses achados corroboram com o fato de as células gigantes multinucleadas presentes no GCCG

serem reativas, enquanto as células mononucleares seriam protagonistas na patogênese dessa lesão.

Steensma e colaboradores (2013) isolaram células CD14<sup>-</sup> de amostras de tumor de células gigantes de ossos longos, realizaram análises para marcadores de linhagem osteoblástica e analisaram a capacidade dessas células “estromais” sofrer diferenciação osteoblástica e induzir osteoclastogênese em co-culturas com células monocíticas. De forma complementar, células do GCCG, quando colocadas em cultura, comportam-se de forma semelhante ao tumor de células gigantes dos ossos longos, do ponto de vista da capacidade de sofrer diferenciação osteogênica (MIGUITA *et al.*, 2022).

Em outros termos, resultados publicados recentemente por nosso grupo demonstraram que as células do GCCG apresentaram autocapacidade de aumentar os níveis de fosfatase alcalina em um padrão tempo-dependente e, sob indução osteogênica, apresentaram aumento do número de depósitos de cálcio e maior expressão dos genes *BGLAP* (osteocalcina), *RUNX2*, *ALPL* (fosfatase alcalina) e *SSP1* (osteopontina). E, do ponto de vista genético, este mesmo estudo demonstrou que as células de GCCG, apresentam mutações restritas às células mononucleares de provável origem mesenquimal. Enquanto as células mononucleares eram positivas para as mutações em *TRPV4* ou *KRAS*, as células gigantes semelhantes a osteoclastos mostraram genótipo selvagem para ambas as mutações (MIGUITA *et al.*, 2022).

Adicionalmente, estas células mesenquimais têm sido chamadas de “estromais”, mas sabe-se que elas são o componente proliferativo dos GCCG. Por consequência, considerando seu papel na tumorigênese, essas células mesenquimais não se enquadram estritamente no conceito de “estroma”.

Em resumo, os resultados dessa dissertação reforçam o panorama de que as células mesenquimais fusiformes ou CD14<sup>-</sup>CD51<sup>-</sup>CD61<sup>-</sup> são centrais na patogênese dos GCCG, enquanto as células mononucleares de origem monocítica (CD14<sup>+</sup>) e as células gigantes semelhantes a osteoclastos (CD51<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>) são reativas.

## 7 CONCLUSÃO

A proliferação das subpopulações de células mononucleares presentes nos GCCG dos maxilares já foi sugerida por diferentes autores, entretanto a caracterização dessas células ainda permanece pouco explorada. Este trabalho expande a compreensão acerca do perfil de populações de células mononucleares que participam na patogênese dessas lesões.

Adicionalmente, este estudo abre precedentes para a expansão de estudos destas lesões em cultivo celular, com a finalidade de explorar terapias medicamentosas mais eficazes para o tratamento da lesão.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL, F. R. *et al.* Quantitative expression analysis of apoptotic/antiapoptotic genes and association with immunolocalization of BAX and BCL-2 in peripheral and central giant cell lesions of the jaws. **Tumor Biol.**, Basel, v. 32, n. 5, p.997-1003, out. 2011.
- BAUMHOER, D. *et al.* Activating mutations in the MAP-kinase pathway define non-ossifying fibroma of bone. **J. Pathol.**, [S.l.], v. 248, n. 1, p.116-22, mai.2019.
- BEHJATI, S. *et al.* Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. **Nat. Genet.** New York, v. 45, n. 12, p. 1479-82, dez. 2013.
- BOER, S. *et al.* Endothelial characteristics in healthy endothelial colony forming cells; generating a robust and valid ex vivo model for vascular disease. **J. Thromb. Haemost.** Oxford, v. 18, n. 10, p. 2721-31, jul. 2020.
- BONETTI, F. *et al.* Peripheral giant cell granuloma: evidence for osteoclastic differentiation. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.70, n. 4, p. 471-5, out.1990.
- BROOKS, P.C.; CLARK, RA; CHERESH, DA. Requirement of vascular integrin  $\alpha\beta 3$  for angiogenesis. **Science.** Washington, v.264, n.5158, p. 567-71, abr. 1994.
- BROOKS, P.J.; GLOGAUER, M.; MCCULOCK, C.A. An Overview of the Derivation and Function of Multinucleated Giant Cells and Their Role in Pathologic Processes. **Am. J. Pathol.**, New York, v.189, n. 6, p.1145-58, jun. 2019.
- CAMARI, C.; TOLENTINO, E.S. Non-surgical treatment as an alternative for the management of central giant cell granuloma: a systematic review. **Clin. Oral Investig.**, Berlin, v. 26, n. 2, p. 2111-32, fev. 2022.
- CHRCANOVIC, B.R.; GOMES, C.C.; GOMEZ, R.S. Central giant cell lesion of the jaws: An updated analysis of 2270 cases reported in the literature. **J. Oral Pathol. Med.** Copenhagen, v. 47, n. 8, p. 731-39, set. 2018.
- CHRCANOVIC, B.R. *et al.* Clinical factors associated with the recurrence of central giant cell lesions. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.48, n.9, p.799-802, out. 2019.

DUONG, L.T. *et al.* Integrins and signaling in osteoclast function. **Matrix Biol.** Stuttgart, v. 19, n. 2, p. 97-105, mai. 2000.

EDWARDS, P.C. Insight into the pathogenesis and nature of Central giant cell lesions of the jaws. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.** Valencia, v.20, n.2, p.196-8, mar.2015.

EL-MOFTY, S.K.; OSDOBY, P. Growth behavior and lineage of isolated and cultured cells derived from giant cell granuloma of the mandible. **J. Oral. Pathol. Copenhagen**, v.14, n. 7, p. 539-52, ago.1985.

EL-NAGGAR, A.K. *et al.* **WHO Classification of Head and Neck Tumours.** 4<sup>a</sup> ed. Lyon: World Health Organization, 2017. v.9, 347p.

FENG, X.; TEILTEUBAUM, S.L. Osteoclasts: New insights. **Bone Res.** Sichuan, v.29, n.1, p. 11-26, mar.2013.

FLANAGAN, A.M. *et al.* The multinucleate cells in giant cell granulomas of the jaw are osteoclasts. **Cancer.** [S.l]. v.62, n.6, p. 1139-45, set.1988.

FLANAGAN, A.M.; SPEIGHT, P.M. Giant cell lesions of the craniofacial bones. **Head Neck Pathol.** Secaucus, v.8, n. 4, p. 445-53, dec. 2014.

GOMES, C.C. *et al.* The highly prevalent H3F3A mutation in giant cell tumours of bone is not shared by sporadic central giant cell lesion of the jaws. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** St. Louis, v. 118, n. 5, p. 583-5, nov.2014.

GOMES, C.C. *et al.* TRPV4 and KRAS and FGFR1 gain-of-function mutations drive giant cell lesions of the jaw. **Nat. Commun.** London, v.9, n.1, p.4572-, nov. 2018.

GOMES, C.C. *et al.* Making sense of giant cell lesions of the jaws (GCLJ): lessons learned from next-generation sequencing. **J. Pathol.** [S.l] v.250, n.2, p.126-33, fev. 2020.

GUIMARÃES, L. M. *et al.* (no prelo) Manifestations of hyperparathyroidism in the jaw bones: concepts, mechanisms and clinical aspects. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** St. Louis, ago. 2021.

ITONAGA, I. *et al.* Phenotypic characterization of mononuclear and multinucleated cells of giant cell reparative granuloma of small bones. **J. Pathol.**, [S.I], v.198, n.30, p.30-6, set. 2002.

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

LANDMANN, R; MÜLLER, B; ZIMMERLI, W. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. **Microbes. Infect.** Paris, v.2, n.3, p. 295-304, mar. 2000.

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

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

MIGUITA, L. *et al.* Central giant cell granulomas of the jaws stromal cells harbour mutations and have osteogenic differentiation capacity, in vivo and in vitro. **J. Oral Pathol. Med.** Copenhagen, v.51, n.2, p.206-16, fev. 2022.

RICHARDSON, J. *et al.* (no prelo) Central giant cell granuloma of the head & neck: A case report and systematic review. **J. Stomatol. Oral Maxillofac. Surg.** [S.I], ago. 2021.

SCHREUDER, W.H. *et al.* Multiple versus solitary giant cell lesions of the jaw: Similar or distinct entities? **Bone**, New York, v.149, n.1, ago.2021.

SOUZA, P.E.; MESQUITA, R.A.; GOMES, R. S. Evaluation of p53, PCNA, Ki-67, MDM2 and AgNOR in oral peripheral and central giant cell lesions. **Oral Dis.** Houndmills, v. 6, n.1, jan.2000.

STEENSMA, M.R. *et al.* Targeting the Giant Cell Tumor Stromal Cell: Functional Characterization and a Novel Therapeutic Strategy. **PLoS ONE.** San Francisco, v.8, n.7, p.1-15, jul.2013.

TAKADA, Y.; YE, X; SIMON, S. The integrins. **Genome Biol.** London, v.8, n.5, p.215-, jun. 2007.

TAYLOR, R.M. *et al.* CD14- mononuclear stromal cells support (CD14+) monocyte–osteoclast differentiation in aneurysmal bone cyst. **Lab. Invest.** Baltimore, v.92, n.4, p.600-5, abr. 2012.

TRANTAFILLIDOU, K. *et al.* Central Giant Cell Granuloma of the Jaws: A Clinical Study of 17 Cases and a Review of the Literature. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.** St. Louis, v.120, n.3, p. 167-74, mar.2011.

WÜLLING, M., DELLING, G., KAISER, E. The nature of giant cell tumor of bone. **J. Cancer. Res. Clin. Oncol.** Berlin, v.127, n.8, p. 467-74, ago. 2001.

ZAMANI, F. *et al.* Induction of CD14 Expression and Differentiation to Monocytes or Mature Macrophages in Promyelocytic Cell Lines: New Approach. **Adv. Pharm. Bull.** Tabriz, v.3, n.2. p. 329-32, dez. 2013

## APÊNDICE A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Caracterização in vitro e in vivo das lesões de células gigantes de maxilares

**Pesquisador:** Carolina Cavalleri Gomes

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 24763719.4.0000.5149

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.582.151

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BELO HORIZONTE, 09 de Março de 2021

---

Assinado por:  
Crissia Carem Paiva Fontainha  
(Coordenador(a))

## **APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) destinado a maiores de 18 anos de idade**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Destinado a indivíduos maiores de 18 anos)

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Caracterização *in vitro* e *in vivo* das lesões de células gigantes de maxilares”**. A lesão de células gigantes é capaz de causar grande destruição óssea e acomete indivíduos de diferentes idades. Nesta pesquisa pretendemos compreender melhor quais os tipos de células que existem nesta lesão, sua interação e causas que levam o desenvolvimento desta lesão para auxiliar em possíveis tratamentos futuro.

Caso você autorizar sua participação nesta pesquisa, será efetuada a coleta de um fragmento da lesão após a cirurgia. Este fragmento será cultivado e multiplicado em laboratório para que possamos estudar os processos que ocorrem dentro desta lesão e que ocasionam o desenvolvimento dela. Ressaltamos que o método de coleta do material a ser pesquisado não requer intervenção adicional, além do procedimento cirúrgico o qual você será submetido para diagnóstico e tratamento da lesão, e não comprometerá nem o diagnóstico da lesão e nem o seu tratamento. Uma pequena amostra de tecido normal da mucosa da boca também será coletada durante a realização dos pontos/acertos da ferida cirúrgica. A coleta do material normal vai permitir que possamos comparar os resultados obtidos neste material com os resultados obtidos na lesão. Todo este material poderá ser mantido por um longo período de tempo e nenhum uso comercial será feito em hipótese alguma. O material cultivado do tumor poderá ser usado também em outros estudos posteriores que podem revelar a alterações genéticas que aumentam a chance de desenvolver algumas doenças, mediante sua permissão. Você tem o direito de pedir que o material seja descartado a qualquer momento, se desejar.

Todos os resultados serão utilizados apenas para pesquisa e ensino. Todas as informações coletadas serão mantidas em sigilo, apenas os pesquisadores envolvidos nesta pesquisa terão acesso aos dados. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar, garantindo o seu anonimato ao publicar os resultados desta pesquisa.

Estamos à sua disposição para esclarecimentos sobre a metodologia empregada, antes e durante todo o curso da pesquisa. Em qualquer fase desta pesquisa você terá a liberdade para se recusar a participar ou para retirar seu consentimento sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu tratamento. Este estudo não oferecerá riscos além daqueles próprios da cirurgia que será submetido(a) e aqueles relacionados à ansiedade de participar de um projeto de pesquisa. Este estudo também não terá nenhum custo ou ressarcimento para você.

Esta pesquisa ajudará a entender melhor os mecanismos que podem levar ao desenvolvimento das lesões de células gigantes de maxilares e isso será muito importante para que melhorar as condutas de tratamento da doença no futuro.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no **laboratório de biologia molecular (sala 3205) da faculdade de Odontologia da UFMG** e a outra será fornecida ao Sr. (a). Neste mesmo local, os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão sua com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa “Caracterização *in vitro* e *in vivo* das lesões de células gigantes de maxilares”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

( ) Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

( ) Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante: \_\_\_\_\_

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

---

Nome completo do responsável pelo participante  
Data

---

Assinatura do responsável pelo participante

**Carolina Cavalieri Gomes**

Endereço: Av Antonio Carlos, nº 6627

CEP: 31370-901 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 34092895

E-mail: gomes.carolinac@gmail.com

---

Assinatura do pesquisador responsável  
Data

**Lucyene Miguita Luiz**

Endereço: Av Pres. Antonio Carlos, nº 6627

CEP: 31370-901 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 34092895/ (11)982262060

E-mail: lmiguita@gmail.com

---

Assinatura do pesquisador (pós-doutoranda)  
Data

**Raphaela Alvarenga Braga de Freitas**

Endereço: Av Pres. Antonio Carlos, nº 6627

CEP: 31370-901 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 34092895

E-mail: raphaela400@hotmail.com

---

Assinatura do pesquisador (mestranda)

Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

## **APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) destinado a pais de menores de 18 anos de idade**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Destinado a pais de indivíduos menores de 18 anos)

O seu/sua filho (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “Caracterização *in vitro* e *in vivo* das lesões de células gigantes de maxilares”. Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte das lesões orais. A utilização do material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se Sr. (a) concordar em outros futuros. Nesta pesquisa pretendemos entender melhor quais os tipos de células que existem nesta lesão. Ressaltamos que o método de coleta do material a ser pesquisado não requer intervenção adicional, além do procedimento cirúrgico o qual o seu/sua filho(a) será submetido para tratamento. O estudo oferecerá riscos mínimos a saúde do seu/sua filho (a), sendo que um dos possíveis riscos poderá ser a perda de sigilo das informações. Para minimizar esse risco apenas os pesquisadores terão acesso aos dados, garantindo o anonimato, e serão utilizados apenas para pesquisa e ensino. Quanto aos benefícios, a pesquisa contribuirá para melhor entendimento da causa dessas lesões, possibilitando um diagnóstico final mais preciso e um tratamento mais adequado.

Para participar deste estudo o seu/sua filho (a) não terá nenhum, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito à indenização. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico coletado, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o seu/sua filho (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir do material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. O nome do seu/sua filho (a) ou o material que indique a participação não será liberado sem a sua permissão. O seu/sua filho/filha não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no **laboratório de biologia molecular (sala 3205) da faculdade de Odontologia da UFMG** e a outra será fornecida ao Sr. (a). Neste mesmo local, os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores

tratarão a identidade do seu/sua filho (a) com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa “Caracterização *in vitro* e *in vivo* das lesões de células gigantes de maxilares”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

( ) Concordo que o material biológico do meu/minha filho (a) seja utilizado somente para esta pesquisa.

( ) Concordo que o material biológico do meu/minha filho (a) possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante: \_\_\_\_\_

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

---

Nome completo do responsável pelo participante

Data

---

Assinatura do responsável pelo participante

Pesquisadores:

**Carolina Cavalieri Gomes**

Endereço: Av Antonio Carlos, nº 6627

CEP: 31370-901 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 34092895

E-mail: gomes.carolinac@gmail.com

---

Assinatura do pesquisador responsável  
Data

**Lucyene Miguita Luiz**

Endereço: Av Pres. Antonio Carlos, nº 6627

CEP: 31370-901 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 34092895/ (11)982262060

E-mail: lmiguita@gmail.com

---

Assinatura do pesquisador (pós-doutoranda)  
Data

**Raphaela Alvarenga Braga de Freitas**

Endereço: Av Pres. Antonio Carlos, nº 6627

CEP: 31370-901 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 34092895

E-mail: raphaela400@hotmail.com

---

Assinatura do pesquisador (mestranda)

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br). Tel: 34094592.

## APÊNDICE D – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido para menores (TALE)

### TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES

Você está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa intitulada: “**Caracterização *in vitro* e *in vivo* de células das lesões de células gigantes de maxilares**” que será realizada no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB - UFMG), para que faça a doação do tecido da lesão removida durante a cirurgia para seu tratamento.

**1. Objetivo da pesquisa:** é analisar as células existentes na lesão de células gigantes multinucleadas para melhor entender o processo de como ocorre o desenvolvimento desta lesão.

**2. Procedimentos:** As amostras utilizadas neste estudo serão obtidas a partir do tecido tumoral removido de você através do procedimento cirúrgico indicado e necessário para o seu diagnóstico e tratamento. Para a obtenção deste material não será efetuado nenhum procedimento adicional.

**3. Riscos:** A participação na pesquisa citada não apresenta risco significativo de ordem física ou psicológica para o participante e sua identidade será mantida em sigilo durante e após o término da pesquisa. Todos os dados coletados serão mantidos em anonimato. E ressaltamos que o método de coleta do material a ser pesquisado não requer nenhuma outra intervenção adicional, além do procedimento cirúrgico o qual seu (sua) filho (a) será submetido para tratamento.

**4. Benefícios:** Esta pesquisa poderá contribuir com maior conhecimento sobre o desenvolvimento destas lesões e permitir o estabelecimento de tratamentos mais adequados, sem benefício direto para o participante da pesquisa.

**5. Custo:** O participante da pesquisa não terá nenhum gasto para a realização da pesquisa uma vez que tudo será fornecido gratuitamente pelos pesquisadores responsáveis.

**6. Sigilo:** Não será revelada, sob nenhuma hipótese, a identidade do participante da pesquisa bem como de seu responsável, sendo que as informações fornecidas serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis.

**7. Informações adicionais:** Você tem plena liberdade de retirar seu consentimento e deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem qualquer penalização por parte do pesquisador responsável ou prejuízo do tratamento, caso estiver fazendo na instituição e sem perder os benefícios descritos acima.

As informações contidas neste documento são fornecidas pelos responsáveis desta pesquisa, Profa. Dra. Carolina Cavalieri Gomes e Lucyene Miguita Luiz, ambas do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os pesquisadores responsáveis estarão à disposição para esclarecer qualquer dúvida e assistência no endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, e no e-mail: gomes.carolinac@gmail.com

Este documento está sendo elaborado em 2 vias sendo uma do participante e outra do pesquisador responsável.

Após ter sido informado e ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelos pesquisadores, concordo em participar como voluntário desta pesquisa, doando o tecido coletado.

Assinatura do participante da pesquisa: \_\_\_\_\_

Nome por extenso do participante: \_\_\_\_\_

DATA \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do representante legal para participação da pesquisa.

Pesquisadores:

**Carolina Cavalieri Gomes**

Endereço: Av Antonio Carlos, nº 6627

CEP: 31370-901 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 34092895

E-mail: gomes.carolinac@gmail.com

---

Assinatura do pesquisador responsável

Data

**Lucyene Miguita Luiz**

Endereço: Av Pres. Antonio Carlos, nº 6627

CEP: 31370-901 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 34092895/ (11)982262060

E-mail: lmiguita@gmail.com

---

Assinatura do pesquisador (pós-doutoranda)

Data

**Raphaela Alvarenga Braga de Freitas**

Endereço: Av Pres. Antonio Carlos, nº 6627

CEP: 31370-901 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 34092895

E-mail: raphaela400@hotmail.com

---

Assinatura do pesquisador (mestranda)

Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

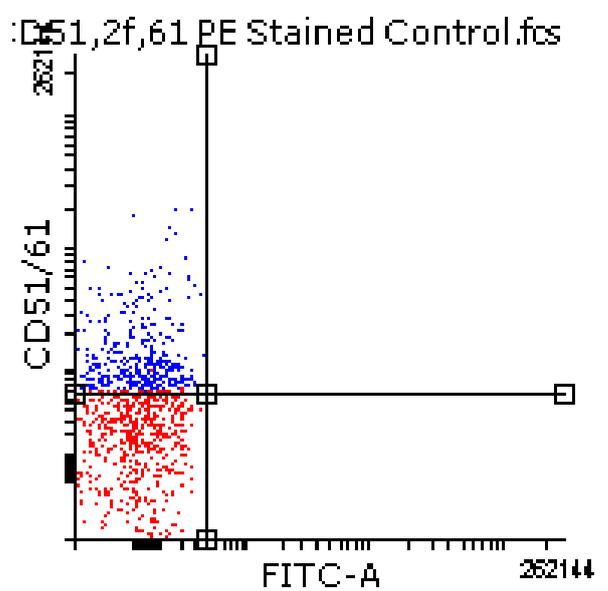
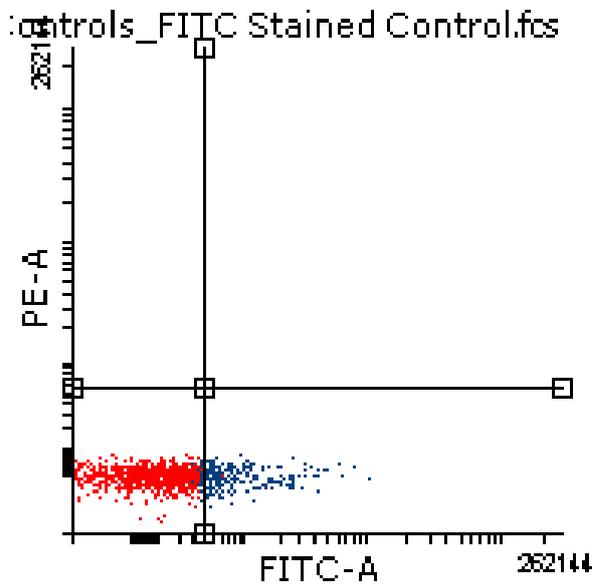
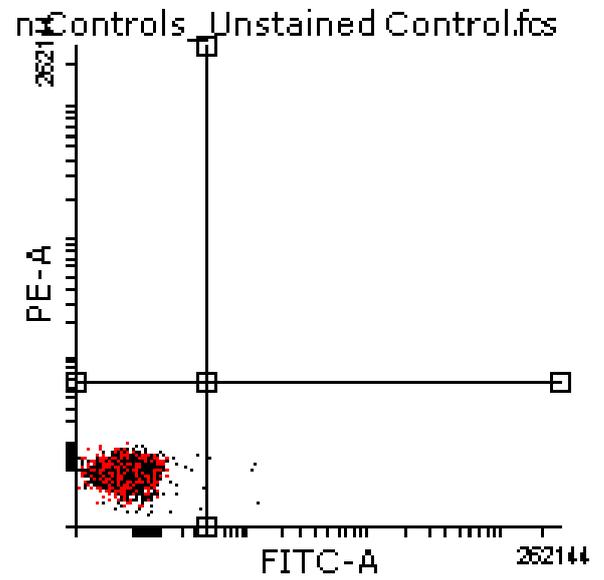
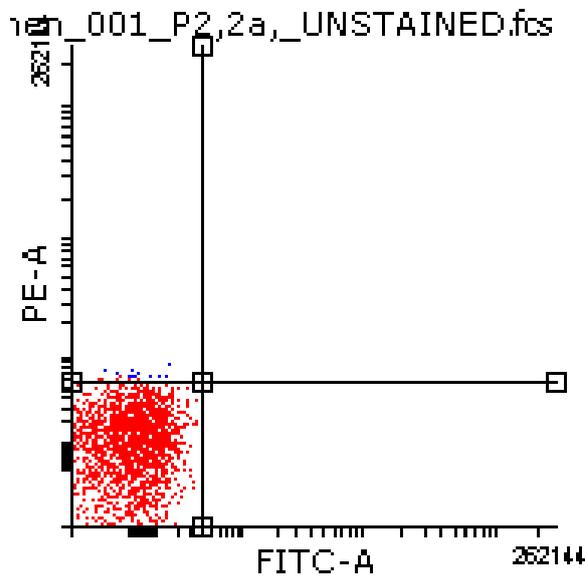
**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

### APÊNDICE E – Controle FITC e PE no Flowing Software 2.5.1



# APÊNDICE F – Primeira página do artigo publicado no periódico *Journal of Oral Pathology and Medicine*



Received: 3 November 2021 | Revised: 7 December 2021 | Accepted: 10 January 2022  
DOI: 10.1111/jop.13274

ORIGINAL ARTICLE

Journal of Oral Pathology and Medicine | WILEY

## Central giant cell granulomas of the jaws stromal cells harbour mutations and have osteogenic differentiation capacity, in vivo and in vitro

Lucyene Miguita<sup>1</sup> | Juliana Cristina de Souza<sup>1</sup> | Victor Coutinho Bastos<sup>1</sup> |  
Núbia Braga Pereira<sup>1</sup> | Raphaela Alvarenga Braga de Freitas<sup>2</sup> |  
Leticia Martins Guimarães<sup>1</sup> | Gleide Fernandes de Avelar<sup>3</sup> | Luciana Oliveira Andrade<sup>3</sup> |  
Walderez Ornelas Dutra<sup>3</sup> | Fábio Dumas Nunes<sup>4</sup> | Wagner Henriques Castro<sup>2</sup> |  
Julio Cesar Tanos de Lacerda<sup>5</sup> | Amanda Maria Sena Reis<sup>1</sup> | Vanessa Fátima Bernardes<sup>1</sup> |  
Marina Gonçalves Diniz<sup>1</sup> | Ricardo Santiago Gomez<sup>2</sup> | Carolina Cavalieri Gomes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Biological Science Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>2</sup>Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>3</sup>Department of Morphology, Biological Science Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>4</sup>Department of Stomatology, School of Dentistry, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>5</sup>Oral Medicine Service, Odilon Behrens Hospital, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

### Correspondence

Carolina C. Gomes, Department of Pathology, Biological Science Institute (ICB), 3<sup>rd</sup> floor, Block G, Room 60, Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 31270-901, Belo Horizonte - MG, Brazil.  
Email: carolinacgomes@ufmg.br; gomes.carolinac@gmail.com

### Funding information

This work received funding from CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brazil. C.C.G., R.S.G., F.D.N., W.O.D. and L.O.A. are research fellows at the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil. L.M. is a research fellow at the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)/PNPD grant number 88887409369/2019-00. V.C.B. and L.M.G. receives a CAPES scholarship.

### Abstract

**Background:** Central giant cell granulomas (CGCG) of the jaws are osteolytic lesions that may behave aggressively and respond poorly to surgery. Microscopically, in addition to giant cells, there is a mononuclear cell population composed of macrophage/monocytic cells and spindle-shaped cells of mesenchymal origin. Seventy two percent of these tumours harbour mutually exclusive *TRPV4*, *KRAS* and *FGFR1* mutations. We aimed to assess the mutational status of mononuclear and giant cells and the osteogenic potential of stromal cells in vitro and in vivo.

**Methods and Results:** We screened CGCG for signature mutations and used laser capture microdissection to demonstrate that the mutations are restricted to the mononuclear cells. Additionally, we established CGCG primary cell culture and observed that the cells retained the mutations throughout passages. By flow cytometry, we observed predominance of CD14<sup>+</sup>CD51<sup>+</sup>CD61<sup>-</sup> cells, consistent with the expected profile for stromal cells. Considering the mesenchymal origin of stromal cells, we assessed the osteogenic differentiation potential of CGCG cells in culture by cytochemistry (von Kossa and alizarin red staining), alkaline phosphatase (ALP) activity assay and gene expression of osteogenic markers. CGCG cells presented self-capacity to increase ALP levels in a time-dependent manner and under osteogenic induction presented increasing number of calcium deposits, and overall higher expression of

Lucyene Miguita, Juliana Cristina de Souza, and Victor Coutinho Bastos contributed equally to the study.

© 2022 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd.

206 | wileyonlinelibrary.com/journal/jop

J Oral Pathol Med. 2022;51:206–216.