



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**CIRUGÍA ORAL Y MAXILOFACIAL**

**TÍTULO**

**“EXPRESIÓN DE METALOPROTEINASAS Y PROTEÍNAS  
APOPTÓTICAS/ANTIAPOPTÓTICAS EN LESIONES DE  
CÉLULAS GIGANTES Y SU RELACIÓN CON EL  
COMPORTAMIENTO CLÍNICO”**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR EN  
CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

**P R E S E N T A:**

**MTRO. ALEJANDRO ALONSO MOCTEZUMA**

**TUTORA:**

**DRA. ELBA ROSA LEYVA HUERTA**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**MÉXICO, CD MX. JUNIO 2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ÍNDICE GENERAL

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
3. Antecedentes.....	4
4. Expresión de metaloproteinasas (MMP-1, -2, -3, -9 y -13) .....	11
5. Expresión de Bax y Bcl-2.....	13
6. Planteamiento del problema.....	15
7. Justificación.....	16
8. Pregunta de investigación.....	16
9. Hipótesis.....	16
10. Objetivo general.....	16
11. Objetivos específicos.....	17
12. Materiales y métodos.....	17
13. Resultados.....	25
14. Discusión.....	33

15. Conclusión.....	35
16. Perspectivas.....	35
17. Referencias.....	35

## 1. RESUMEN

**Introducción:** Las lesiones de células gigantes son entidades benignas, localizadas, no neoplásicas, que pueden presentar una proliferación osteolítica agresiva. De acuerdo a su comportamiento clínico pueden clasificarse como agresivas y no agresivas. **Objetivo:** Analizar la asociación entre la expresión de metaloproteinasas, proteínas apoptóticas y antiapoptóticas con el comportamiento agresivo de las lesiones de células gigantes de los maxilares. **Materiales y métodos:** Estudio de casos y controles. Se calculó un tamaño de muestra para dos proporciones independientes con 30 casos por grupo. Se utilizó la base de datos del laboratorio de Patología Bucal de la FO, UNAM. Se realizaron cortes histológicos y se tiñeron con H&E. Por medio de historia clínica y estudios radiográficos se determinó su agresividad y su distribución epidemiológica. Para la inmunohistoquímica se usaron los anticuerpos MMP-1, 2, 3, 9 y 13; bcl-2 y bax. El inmunomarcaje se analizó en con el sistema ImageLab® para medir la Densidad Óptica (DO). Para el análisis de los resultados se realizó una prueba de chi-cuadrada ( $p < 0.05$ ). Se determinó la expresión génica de todos los casos positivos por lo menos a un anticuerpo de las 3 familias de las MMPs. Con un total de 10 agresivos y 5 no agresivos, Se estandarizado y realizó la técnica RT-PCR y se visualizó la expresión génica por electroforesis. La foto-documentación se realizó con el sistema GDS (Axygen, NY). **Resultados:** La inmunoexpresión de MMP-9 presento diferencias significativas con 73.3% casos positivos en agresivos y 26.7% en no agresivos ( $p = .03$ ). Bax, Bcl-2 se expresaron en todos los casos. MMP-1, 2, 3 y 13 no presentaron diferencias estadísticas; sin embargo, presentaron una tendencia a la mayor expresión en los casos agresivos. No hubo diferencias significativas en el análisis de densidad óptica. Se obtuvo expresión para todos los genes siendo mayor en los casos agresivos. **Conclusiones:** No se observo asociación entre la agresividad y los marcadores de apoptosis Bax y Bcl-2. La MMP-3 y MMP-9 pueden considerarse como indicadores de riesgo para ayudar a determinar la agresividad en las lesiones de células gigantes.

## ABSTRACT

**Introduction:** Giant cell lesions are benign, localized, non-neoplastic entities that can present an aggressive osteolytic proliferation. According to their clinical behavior they can be classified as aggressive and non-aggressive. **Objective:** To analyze the association between the expression of metalloproteinases, apoptotic and antiapoptotic proteins with the aggressive behavior of giant cell lesions of the jaws. **Materials and methods:** Study of cases and controls. A sample size was calculated for two independent proportions with 30 cases per group. The database of the Oral Pathology Laboratory of the FO, UNAM was used. Histological sections were made and stained with H&E. By means of clinical history and radiographic studies, its aggressiveness and its epidemiological distribution were determined. For immunohistochemistry, MMP-1, 2, 3, 9 and 13 antibodies were used; bcl-2 and bax. The immunolabeling was analyzed with the ImageLab® system to measure Optical Density (OD). For the analysis of the results, a chi-square test was performed ( $p < 0.05$ ). The gene expression of all positive cases was determined for at least one antibody of the 3 families of MMPs. With a total of 10 aggressive and 5 non-aggressive, the RT-PCR technique was standardized and performed and gene expression was visualized by electrophoresis. Photo-documentation was performed with the GDS system (Axygen, NY). **Results:** The immunoexpression of MMP-9 presented significant differences with 73.3% positive cases in aggressive and 26.7% in non-aggressive ( $p = .03$ ). Bax, Bcl-2 were expressed in all cases. MMP-1, 2, 3 and 13 did not present statistical differences; however, they showed a tendency to greater expression in aggressive cases. There were no significant differences in the optical density analysis. Expression was obtained for all genes, being higher in aggressive cases. **Conclusions:** No association was observed between aggressiveness and apoptosis markers Bax and Bcl-2. MMP-3 and MMP-9 can be considered as risk indicators to help determine the aggressiveness of giant cell lesions.

## 2. INTRODUCCIÓN

El comportamiento clínico de las lesiones de células gigantes (LCGs) es muy variado y ha sido sujeto a numerosos estudios para determinar su grado de agresividad. Estas lesiones pueden presentarse en los maxilares como en los huesos largos, algunos autores mencionan que las que se desarrollan en huesos largos son distintas por tener un comportamiento biológico más agresivo; sin embargo, otros estudios no han encontrado diferencias. El tratamiento de las lesiones presentes en los maxilares han sido un reto para el cirujano maxilofacial, debido a la variabilidad de su comportamiento; ya que en algunas ocasiones pueden ser de crecimiento lento y asintomáticas; mientras que en otras son de crecimiento acelerado, destructivas y dolorosas; por lo que requieren tratamientos quirúrgicos agresivos como resecciones segmentarias o en bloque de los maxilares con alta morbilidad funcional y estética con un seguimientos a largo plazo. Se han clasificado de acuerdo con sus características clínicas y radiográficas en agresivas y no agresivas; aunque la clasificación es útil, existen lesiones que por sus características son difíciles clasificar con estos criterios.

La identificación de metaloproteinasas de la matriz extracelular y proteínas involucradas en la apoptosis como marcadores moleculares de estas lesiones podrían ayudar a determinar con mayor precisión el comportamiento y guiar al cirujano para determinar el tratamiento y el seguimiento clínico radiográfico.

Por lo que se requiere estudiar si existen mecanismos derivados de las propias células características de esta lesión que estimulen la degradación del tejido óseo que en condiciones fisiológicas no existiría. Y si existe relación con las proteínas encargadas de la supervivencia y la muerte celular.

### 3. ANTECEDENTES

La OMS en 2017 incluye a las lesiones de células gigantes (LCGs) como un grupo de lesiones benignas, localizadas y no neoplásicas; que pueden presentar una proliferación osteolítica agresiva. Las define como lesiones intraóseas con tejido fibroso celular, múltiples focos de hemorragia, presencia de células gigantes y con áreas de hueso neoformado (1-7). Entre estas lesiones encontramos al *Granuloma de Células Gigantes*, el *Quiste Óseo Aneurismático* (QOA), *Querubismo* y el *Quiste Óseo Solitario* (Tabla 1)(1-6, 8). Se ha encontrado cierta asociación entre la LCCG y algunas condiciones genéticas como el Síndrome de Noonan, Síndrome de Ramon, Síndrome de Jaffe Campanacci, enfermedad de Paget y neurofibromatosis tipo I (5, 6, 9, 10).

El granuloma central de células gigantes fue descrito por primera vez por Jaffe en 1953 (1, 2, 5, 11-15). Antes de este periodo fue diagnosticado como un tumor de células gigantes, el cual era observado con mayor frecuencia en huesos largos. Jaffe propuso el nombre de “Granuloma reparativo de células gigantes”, sin embargo, este termino ha sido controversial debido al comportamiento de la lesión en diferentes pacientes, por lo que el termino reparativo fue descartado de la nomenclatura, no encontrándose actualmente dentro de la clasificación de la OMS (1, 2, 5, 11, 12, 14, 16). Actualmente la OMS lo denomina “*Lesión Central de Células Gigantes*” definiéndola como una proliferación osteolítica, benigna, localizada y algunas veces agresiva, formada por tejido fibroso, hemorragia, depósitos de hemosiderina y células gigantes con formación de hueso reactivo. Esta lesión puede ser central o periférica. (1-8).

**Tabla 1.** Clasificación de tumores óseos maxilofaciales. OMS 2017

<b>Lesiones de células gigantes y quiste óseo simple</b>
1. Granuloma central de células gigantes
2. Granuloma periférico de células gigantes
3. Querubismo
4. Quiste óseo aneurismático
5. Quiste óseo simple

La LCCG representa del 7 al 10% de los tumores benignos de los maxilares. Se estima que se presenta en 1.1 casos en un millón de personas, principalmente entre la primera y la tercera década de la vida, afectando a niños y adultos jóvenes, aproximadamente entre los 2 y 30 años. Tiene predilección por el género femenino con una razón 2:1 con respecto al masculino; Involucra principalmente el sector anterior de la mandíbula adelante del primer molar; con frecuencia sobrepasa más



allá de la línea media, cuando se desarrolla en el maxilar afecta la zona anterior a los caninos (1, 3, 6, 8, 11-13, 15-21). Su etiología y patogénesis es desconocida (1-3, 11-13, 15, 17, 22-24); su contraparte periférica se considera reactiva y su origen es a partir del tejido conectivo del periostio o del ligamento periodontal (1, 2, 8, 14, 17, 23, 24).

En la actualidad no se ha definido su perfil genético y carece de mutaciones puntuales en el gen H3F3A, como sucede en el tumor de células gigantes de huesos largos, existe asociación con el síndrome de Noonan y Neurofibromatosis tipo I que presentan mutaciones en los genes que codifican a proteínas específicas de la vía RAS/MAPK (5, 6, 10, 25).

Algunas teorías sobre el origen de las lesiones de células gigantes están relacionadas con procesos del desarrollo de los dientes en los niños; ya que el gen SH3BP2 incrementa la actividad de los osteoblastos y osteoclastos durante la última etapa de la odontogénesis; otra teoría es que existe una mutación en este mismo gen lo que altera la activación normal de los osteoclastos modificando la osteoclastogénesis, desregulando la paratohormona (PTH) y la proteína relacionada con la PTH (PTHrP), esta última regula la expresión de osteoprotegerina en las células foliculares del germen dental, causando osteoclastogénesis. Ha sido considerado que la alteración de este mismo gen SH3BP2 regula a MSX-1 alterando la diferenciación osteoclástica con la subsecuente formación de tejido indiferenciado(2, 8, 26).

Dentro de la fisiopatología aun no totalmente comprendida, se considera que las células gigantes multinucleadas características de esta lesión, se forman a partir de una respuesta *inflamatoria granulomatosa* en la que se localizan macrófagos con aspecto de células epitelioides, rodeados por linfocitos y ocasionalmente por células plasmáticas. Esta inflamación granulomatosa crónica se divide en dos fases, la primera que consiste en la organización de los macrófagos; y la segunda en la cual por medio del contacto de sus membranas celulares forman un nódulo celular llamado "granuloma maduro", en esta fase los macrófagos tienen la mayor actividad lisosómica y es cuando se pueden transformar en CGM debido a la estimulación del gamma-interferón alrededor del agente patógeno. Esta última fase puede seguir dos vías: la primera que es cuando se destruye el agente patógeno, las células se disgregan y el tejido se restituye. Y la segunda cuando no se destruye el agente patógeno y se pasa a la fase 3 en la cual se presenta la "transformación epitelioides" formando células gigantes. La prolongación de la tercera fase producirá necrosis central por parte de enzimas lisosómicas liberadas por los macrófagos. Este es el mecanismo como se forman las células gigantes en respuesta a un agente extraño ya sea endógeno o exógeno, pero aun no se sabe con certeza como se desarrollan

en la LCCG. Esta podría ser una explicación de por qué su origen puede ser traumático e inflamatorio(27-29). También se ha demostrado que los osteoclastos y las CGM presentan similares características funcionales y fenotípicas como la expresión de Receptor Activador Nuclear Kappa (RANK), que aumenta la osteoclastogénesis y resorción ósea (27-30). Otra teoría sobre la formación de las CGM se da durante la angiogénesis, cuando se desarrolla una lesión de células gigantes y no se produce una formación completa de su red vascular se agregan monocitos por la liberación de la proteína quimiotáctica de monocitos-1 y al factor de crecimiento transformante  $\beta$  (secretadas por las células estromales). Entonces estas proteínas estimulan a células estromales, monocitos y macrófagos dando lugar a la formación de CGM que expresan el Ligando Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa B (RANKL). Por lo que se puede sugerir que las células que participan en el desarrollo de una LCGs son las células estromales, las CGM y los monocitos y/o macrófagos (27-30). Se ha propuesto un mecanismo por el cual una CGM y las células estromales mononucleares inducen la resorción ósea patológica, es por la probable unión de RANKL del osteoblasto con el RANK expresado en una CGM (5, 10, 27).

Clínicamente estas lesiones se han caracterizado por presentarse en adultos jóvenes y con una predilección por el sexo femenino. Su localización más común es en mandíbula con relación al maxilar (figura 1) (1, 3, 7, 8, 11-13, 15-21, 26). En algunos casos pueden extenderse a la región craneofacial y causar asimetría (1-3, 7, 8, 11, 15-17, 24, 26).

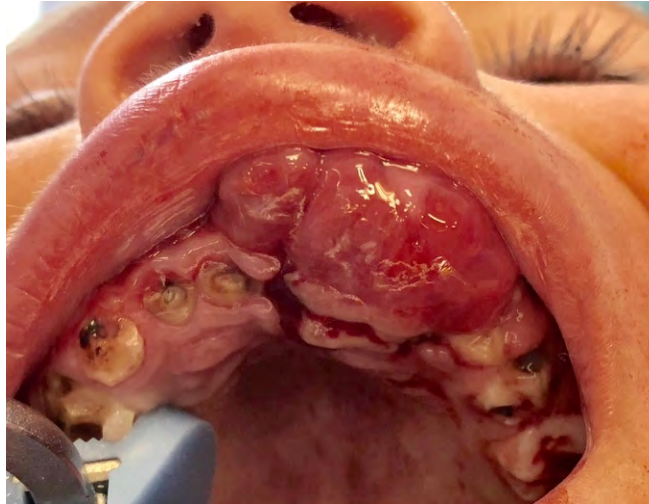


Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial, FO UNAM

**Figura 1.** Lesión central de células gigantes agresiva. Se observa aumento de volumen eritematoso, desplazamiento de incisivos inferiores y expansión de proceso alveolar.

Las lesiones periféricas (LPCGs) se consideran reactivas exofíticas que se presentan en la encía y reborde alveolar con aspecto nodular y color azul-rojizo (1,

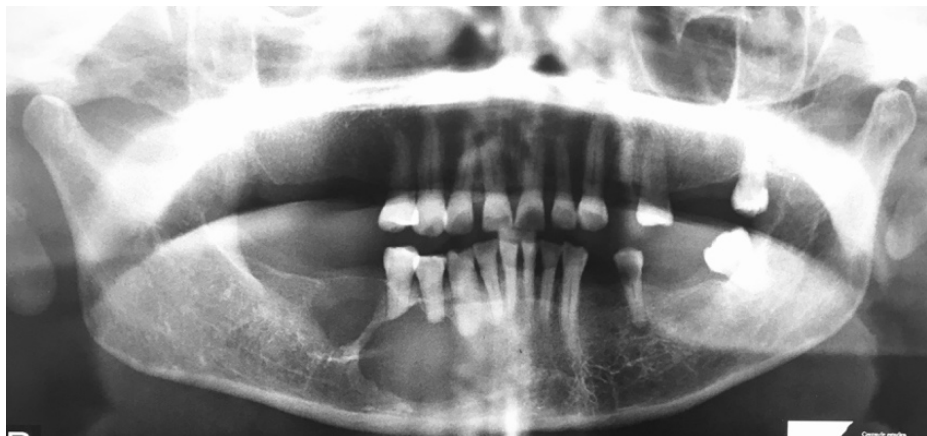
2, 4, 7, 8, 14, 17, 23, 24). Es más común entre quinta y sexta década de la vida con predilección por el sexo femenino. Las lesiones agresivas pueden ocasionar desplazamiento de dientes y erosión ósea superficial (figura 2) (1, 14, 17, 24). El tratamiento consiste en la resección quirúrgica con curetaje para evitar la recidiva (1, 7, 8, 14, 24).



Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial, FO UNAM

**Figura 2.** Lesión periférica de células gigantes agresiva. Se observa aumento de volumen eritematoso en proceso alveolar ocasionando protrusión del labio superior.

La LCCG se presenta como una zona radiolúcida, puede ser unilocular o multilocular, generalmente es bien definido, puede ocasionar perforación y/o expansión de corticales, respeta el canal del nervio dentario inferior. La LPCG puede ocasionar una erosión en el hueso adyacente en forma de una concavidad; que se forma por aumento de tamaño y compresión de la lesión sobre las corticales. También puede observarse desplazamiento dental (1, 7, 8, 14, 24).



Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial, FO UNAM

**Figura 3.** Ortopantomografía de una LCCG agresiva. Se observa zona radiolúcida unilocular, perforación de corticales y rizólisis de 43, 44 y 45.

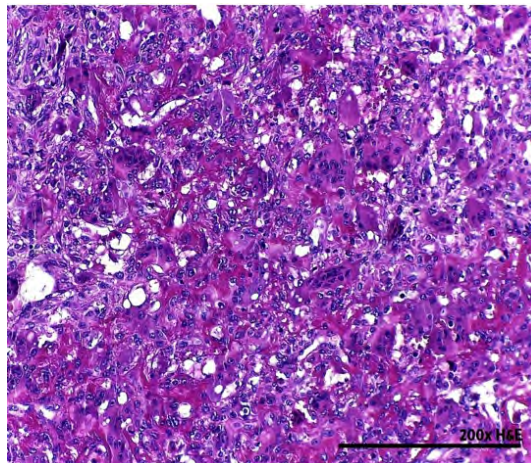
Macroscópicamente estas lesiones tienen un aspecto firme, liso, bien circunscritas de color marrón-rojizo y de apariencia hemorrágica (figura 4) (6, 9).



Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial, FO UNAM

**Figura 4.** Macroscopia de una lesión central de células gigantes. Especimen color marrón con incisivos, laterales y canino.

Microscópicamente se caracterizan por presentar numerosas células gigantes multinucleadas tipo osteoclasto, células estromales mononucleadas en forma de uso en un tejido fibroso denso y vascular, con zonas de hemorragia y presencia de hemosiderina. Puede presentar una arquitectura lobular separada por septos fibrosos con osteoide y hueso reactivo (figura 5). Se debe excluir de las otras lesiones (Querubismo o QOA) correlacionando las características clínicas y radiográficas; ya que histológicamente no presentan diferencias. Las CGM muestran reactividad a marcadores de osteoclastos y macrófagos; mientras que las células estromales mononucleares a marcadores de proliferación, por lo que se considera que estas últimas son el componente proliferativo. (3, 4, 6-9, 11, 13, 14, 16-18, 23, 24, 26, 31).

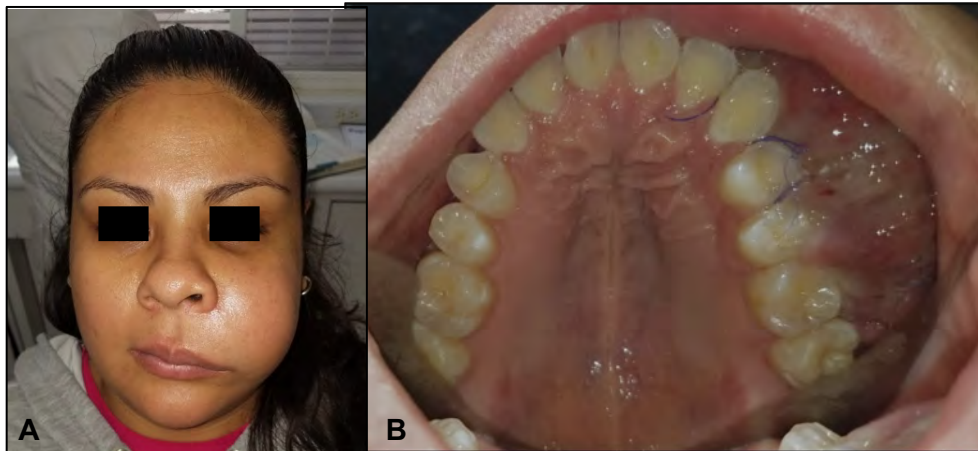


Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial, FO UNAM

**Figura 5** Fotomicrografía H&E. Células gigantes multinucleadas dispersas.



El comportamiento de las LCGs es incierto; algunos casos pueden ser de crecimiento lento y con hallazgos incidentales radiográficamente; mientras otros casos pueden presentar una proliferación rápida y un comportamiento destructivo ocasionando expansión y perforación ósea, desplazamiento de dientes, reabsorción radicular, dolor y parestesia (1, 3, 11, 13, 17, 19, 21-24). Choung et al. (32) para comprender el comportamiento, dar un pronóstico y orientar el tratamiento estas lesiones se han estratificado en agresivas y no agresivas de acuerdo con sus características clínicas y radiográficas (2, 3, 11, 13, 15, 23, 24). Siendo las “no agresivas” asintomáticas, de crecimiento lento, sin perforación de corticales y no recurrentes. En las “agresivas” existe presencia de dolor, crecimiento rápido, expansión ósea, perforación de corticales y recurrencia (figura 6 a y b) (1-3, 5, 8, 11, 13, 15, 18, 23, 24, 31).

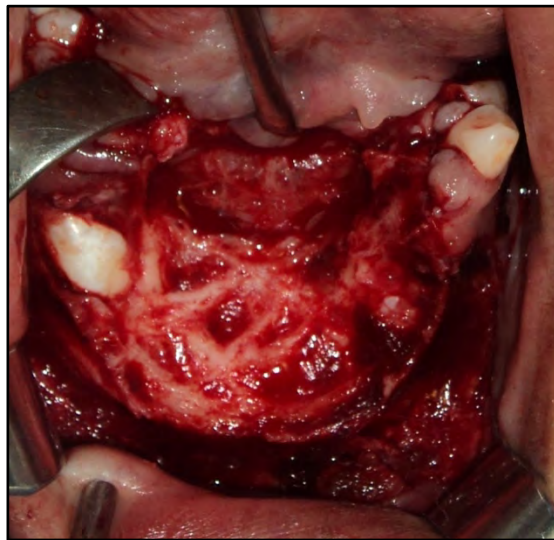


Departamento de Cirugía Oral y Maxilofacial, FO UNAM

**Figura 6** Lesión de células gigantes central agresiva. **A** Se observa asimetría facial del lado izquierdo. **B** Aumento de volumen en proceso alveolar vestibular ipsilateral con desplazamiento palatino de premolares y molares.

Histológicamente se ha buscado asociación entre la celularidad del estroma, número de núcleos en las células gigantes, mitosis, tipo de estroma, presencia de hemorragia y presencias de hueso reactivo con la agresividad clínica sin encontrar hasta el día de hoy resultados significativos (2, 3, 11, 13, 17, 18).

El tratamiento quirúrgico se ha descrito desde un curetaje hasta resecciones en bloque, esto basado en la agresividad de la lesión (1-3, 5, 7, 15, 21, 23, 31, 33-37). En la actualidad el tratamiento más frecuente para la LCCG es quirúrgico, donde se emplean varias técnicas, tales como la *enucleación* en combinación con osteotomía periférica o crioterapia con nitrógeno líquido (figura 7) y la *resección en bloque* simple o con osteotomía (5, 10, 14, 15, 21-26, 31, 32, 34, 35). El tipo de abordaje quirúrgico y la extensión va a depender del tamaño de la lesión y la agresividad que presente. El inconveniente del curetaje en las lesiones agresivas es la recidiva; mientras que en la resección en bloque son las alteraciones funcionales, estéticas y nerviosas como la parestesia (5, 25, 37). El pronóstico con el tratamiento quirúrgico es variable, el curetaje en lesiones con comportamiento agresivo tiene una recurrencia del 13% al 70% (5, 25, 37); mientras que, con la resección en bloque con márgenes libres, la recidiva es nula (5, 29).



Departamento de Cirugía Oral y Maxilofacial, FO UNAM

**Figura 7** Resección quirúrgica con osteotomía periférica de una LCCG agresiva.

Los tratamientos no quirúrgicos son para evitar una cirugía invasiva y destructiva en casos agresivos de mayor tamaño (5, 38). Entre estos esta los siguientes: la *Calcitonina* subdérmica o vía nasal que se emplea con la hipótesis de que las CGM son similares a los osteoclastos y puede inhibir su función y diferenciación. (5, 25, 39, 40). *Interferón Alfa* se utiliza por la naturaleza vascular de estas lesiones, ya que suprime la angiogénesis y en consecuencia la involución de la lesión e induce la

diferenciación de los osteoblastos estimulando el metabolismo óseo y así la formación de hueso (5, 25, 39, 40). Imatinib® es una proteína inhibidora de la tirosinasa c-abl y c-kt que actúa como un agente antiosteolítico y promueve la diferenciación osteoblástica al inhibir factor de crecimiento derivado de plaquetas (5, 25, 39). *Osteoprotegerina* que inhibe al factor receptor activador nuclear ligando  $\kappa\beta$  (RANKL) (5, 39). *Bifosfonatos* usados para inhibir la osteoclastogénesis y provocar la apoptosis de los osteoclastos (25, 34). *Denosumab*® un anticuerpo monoclonal humano que inhibe la resorción ósea, actuando sobre unión RANKL/RANK (5, 41) y finalmente los *Esteroides* intralesionales que inhiben la producción extracelular de proteasas lisosómicas e inducen la apoptosis de los osteoclastos (5, 25, 39, 40).

#### 4. EXPRESIÓN DE METALOPROTEINASAS (MMP-1, -2, -3, -9 y -13)

Las metaloproteinasas (MMPs) de matriz son las enzimas encargadas de la degradación del colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular (ME), son dependientes de zinc. Se encuentran involucradas en procesos fisiológicos como la organogénesis, cicatrización, entre otros y en procesos patológicos como la inflamación, enfermedades autoinmunes y carcinogénesis. Son producidas por fibroblastos, macrófagos, neutrófilos y células epiteliales. Aunque las MMPs comparten varias características distintivas, pueden clasificarse según su estructura molecular y sustrato en subgrupos que incluyen colagenasas, gelatinasas, estromalinas, MMPs de membrana y nuevas MMPs. La secreción de MMPs es estimulada por factores como el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (FCDP), Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FCF), citosinas, Interleucina 1 (IL1), Factor de Necrosis Tumoral (TNF), fagocitosis y estrés físico. Son inhibidas por el Factor de Crecimiento Transformante  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) y por esteroides (42-47). Son expresadas en bajos niveles en tejidos normales en ausencia de inflamación, heridas o un proceso patológico. Una expresión aberrante esta relacionada a destrucción de tejidos (43, 44).

Diversos estudios proponen que en las lesiones osteolíticas existe una asociación entre la degradación y síntesis de la ME en las que se ven implicadas diversas enzimas como MMPs que son capaces de eliminar la matriz orgánica del hueso y crear un ambiente ácido que propicia la disolución del componente mineral inorgánico (42-47). Se han identificado la expresión de varias MMPs en las LCCG por parte de CGM y por células mononucleares estromales con lo que se considera es posible identificar su comportamiento clínico. Entre las MMPs estudiadas están las siguientes:

La metaloproteinasa 1 (MMP-1) o *la colágenasa 1*, se sintetizada por fibroblastos, macrófagos y células endoteliales y epiteliales, se encarga de degradar la colágena tipo I, II, III convirtiéndolo en colágeno desnaturalizado o gelatina. Es una de las principales proteasas que pueden degradar el colágeno del hueso fibrilar que conforma principalmente al periodonto y al hueso alveolar. También degrada otras moléculas de la matriz extracelular (29, 42-48). Existe evidencia que sugiere que las MMP-1 puede regular la osteolisis patológica del hueso, Tobón-Arroyave et al en su estudio encontraron por inmunohistoquímica (HIC) un aumento en inmunoexpresión de MMP-1 en el citoplasma de las CGM y de células estromales en LCCG agresivas ( $P < .01$ )(42).

*La MMP-2 o gelatinasa A*. Sintetizada por células del estroma en condiciones normales en la mayoría de los tejidos. Degrada el colágeno desnaturalizado o gelatina; así como también colágeno tipo I, II y III (29, 42-48), las gelatinas de laminina, elastina y fibronectina. La gelatina del colágeno tipo IV es el componente principal de la membrana basal (MB) y también es degradada por la MMP-2. (43). No ha sido reportada en LCG, pero se ha visto por HIC sobreexpresión de la marca en la MB de los queratoquistes (45).

*La MMP-3 o estromalisina*. Se sugiere que es elaborada por fibroblastos del estroma activado por una glicoproteína de membrana producida por las células tumorales. Su función es degradar la membrana basal, elastina, laminina, fibronectina, otros componentes de la ME y activar varias MMPs como la MMP-9 (29, 42-47). Tampoco a sido estudiada en LCGs.

*La MMP-9 o gelatinasa B* se expresa en baja cantidad por el tejido normal en células endoteliales, fibroblastos y osteoblastos, interviene en la angiogénesis, en la remodelación de las membranas basales vasculares, en la resorción ósea y la regulación de la proteólisis de la matriz ósea no mineralizada, degrada el colágeno tipo I, II y III. La MMP-9 proviene de células con linaje monocito macrófago. Se induce su expresión por medio de mediadores químicos durante la remodelación tisular e invasión tumoral y funciona en conjunto con la MMP-1 (29, 42-47). Tobón-Arroyave et al. estudiaron 30 especímenes de casos agresivos de LCCGs y 12 no agresivos localizados en maxilar y mandíbula. Por medio de HIC encontraron expresión de MMP-1 y MMP-9 en el microambiente de estas lesiones. La inmunolocalización de estas enzimas fue similar, sin embargo, encontraron diferencias de distribución en el citoplasma en los dos grupos. El grupo de agresivos mostraron un marcaje fuerte de MMP-1 y MMP-9 en el citoplasma de las CGM y las CEM histiocíticas, y un marcaje débil en los fibroblastos. Mientras que las no agresivas tuvieron un marcaje de moderado a intenso, localizada principalmente en



el citoplasma de las CGMs y ocasionalmente en algunas CEMs, pero en los fibroblastos la reacción fue nula. La significancia en el grupo de agresivos en la estimación de la expresión de MMP-1 y 9 en relación a los no agresivos fue de  $P < .01$ . Sus controles positivos fueron para MMP-1 granuloma piógeno y para MMP-9 tejido de corazón humano. Los autores con estos resultados sugieren que la intensidad de la tinción y el número de CGM y CEM histiocitarias pueden variar dependiendo la agresividad de la lesión lo que sugiere la participación de los fibroblastos como principales fuentes de MMP-1 y 9 en las LCCG de los maxilares (33, 42).

*MMP-13 o colagenasa 3.* Fue descubierta originalmente en el cáncer de mama (45). También es producida por fibroblastos, epitelio neoplásico maligno, células plasmáticas asociadas a lesiones destructivas de los huesos. Tiene la misma función que la MMP-2 de degradar en colágeno tipo I, II y III, así como también la matriz extracelular (29, 42-47). Esta colagenasa degrada la unión hemidesmosomal entre el colágeno tipo VII del estroma con el filamento de anclaje Laminina-5 (Ln-5) presente en la MB, lo que provoca la migración de células epiteliales que están cercanas a la MB (45). Su presencia en queratoquistes a sido estudiada en la MB (45); sin embargo, aun no hay estudios en LCGs (45).

## 5. EXPRESIÓN DE BAX Y BCL-2

Las proteínas de la familia de Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) son indispensables para que se lleve a cabo el proceso de apoptosis. El miembro prototipo de esta familia es Bcl-2 un acrónimo del linfoma de células B que fue descubierto por primera vez en el punto de interrupción de la t(14;18) en un linfoma folicular de células B No Hodgking. En esta translocación, el gen Bcl-2 es movido de su localización normal 18q21 en proximidad con elementos potentes en la cadena pesada de la inmunoglobulina (IgH) locus 14q32. La familia de Bcl-2 se compone de dos grupos opuestos de proteínas: antagonistas de muerte (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1 y A-1) y agonistas de muerte (BAX, Bak, Bcl-X<sub>s</sub>, BAd, Bid y Hrk). Estos difieren en sus patrones de activación y localización en el tejido, así como en su estructura. Las proteínas codificadas por la familia de Bcl-2 están localizadas en membrana externa mitocondrial, en la membrana nuclear y en el retículo endoplásmico. Los productos de esta familia de genes se dividen en 2 BH1 y BH2 (homólogos de Bcl 1 y 2), que regulan la heterodimerización entre los antagonistas, así como Bcl-2 y los agonistas de muerte como Bax (bcl-2 associated X protein). La muerte celular está inducida por esta familia de genes a través de dimerización. Esto quiere decir que si el nivel de la proteína Bcl-2, la cual inhibe la apoptosis, es más alto que la

que induce la muerte como Bax, las células son protegidas. Por el otro lado si Bax aumenta el efecto opuesto ocurre y las células son susceptibles a la apoptosis. Entonces el radio (o nivel de expresión) de las proteínas que protegen o inducen la muerte celular determina el destino de la célula (49-52).

El proceso de apoptosis puede dividirse en *fase inicial*, durante la cual las caspasas (proteasas cisteínicas con capacidad de escindir proteínas rompiendo el armazón nuclear y el citoesqueleto, activando las DNAsas que degradan el ADN) se hacen catalíticamente activas y la *fase de ejecución* donde esas enzimas actúan produciendo muerte celular(52). La **iniciación** de la apoptosis ocurre principalmente por señales procedentes de dos vías distintas pero convergentes: la vía extrínseca o iniciada en el receptor y la intrínseca o mitocondrial. Ambas vías convergen en la activación de caspasas (52). En la fase de **ejecución** esta mediada por una cascada proteolítica. Las proteasas que median esta fase pertenecen a la familia de las caspasas. Son homologas en mamíferos del gen ced-3 de *C elegans*. Estas caspasas pueden dividirse en dos grupos básicos: iniciador y ejecutor. Las iniciadoras incluyen a las caspasa-8 y caspasa-9. Y ejecutoras como caspasa-3 y caspasa-6 (52).

Existen dos vías por la cuales se da la apoptosis, **la vía extrínseca (receptor)** que inicia por la implicación de un receptor de muerte de la superficie celular. Estos receptores son familia del receptor del factor de necrosis tumoral que contiene un dominio citoplasmático implicado en las interacciones proteína-proteína que se denomina *dominio de muerte*; ya que su papel es esencial para mandar señales apoptóticas. Estos receptores de muerte más conocidos son el receptor TNF de tipo 1 (TNFR1) y una proteína llamada Fas (CD95), entre otros. Cuando el receptor Fas se une a su ligando FasL que se encuentra unido a la membrana, se adhieren tres o más moléculas de Fas para conformar un dominio de muerte denominado FADD (*Fas-associated death domain*). Este dominio FADD se une a los receptores de muerte y a una forma inactiva de la caspasa-8 también a través de un dominio de muerte. Muchas moléculas procaspasa-8 se aproximan y se escinden unas con otras para formar su forma activa. Esta vía puede inhibirse por una proteína llamada FLIP que se une a la procaspasa-8 y evita que puede ser escindida(52). **La vía intrínseca (mitocondrial)** es resultado del aumento de la permeabilidad mitocondrial y liberación de proteína proapoptóticas al citoplasma sin intervención de receptores de muerte. La familia de proteínas Bcl-2 se liberan en esta vía y se encargan de inhibir la apoptosis. Las *antiapoptóticas principales son Bcl-2 y Bcl-x*. Cuando las células no reciben señales de supervivencia se liberan proteínas *proapoptóticas de la misma familia tales como Bak, Bax y Bim*. Cuando disminuye Bcl-2 y Bcl-x, la permeabilidad de la mitocondria aumenta y se liberan proteínas capaces de activar de la cascada de las caspasas. Una de estas proteínas es el

“citocromo C” que se une a una proteína denominada Apaf-1 (*apoptosis activating factor-1*) y activa a la caspasa-9. Otras proteínas como el factor inductor de apoptosis (AIF), penetran en el citoplasma donde se unen y neutralizan, a diversos inhibidores de la apoptosis, cuya función normal es bloquear las caspasas. Esta vía es un equilibrio entre las moléculas proapoptóticas y protectoras que regulan la permeabilidad mitocondrial y la liberación de inductores de muerte que están normalmente secuestrados dentro de la mitocondria (52).

Amaral et al. realizó un estudio en 6 muestras de LCCG y 6 de LPCG mediante IH con el cual determinó la expresión de Bax y Bcl-2, así como también de caspasa 3 activada y se identificó la localización de estas proteínas en las células. Para confirmar la localización de la actividad apoptótica se utilizó desoxinucleótido transferasa dUTP (TUNEL). Los resultados obtenidos fueron en cuantificación relativa de Bcl-2 y Bax mediante el índice apoptótico, con el que se obtuvo que se encuentra aumentado en casi todas las lesiones tanto centrales como periféricas en comparación con la mucosa oral normal. En la inmunotinción se observó que las proteínas se encuentran en las células gigantes de las lesiones centrales y periféricas, las células mononucleares tienen escasa o nula actividad apoptótica. Concluyo que hay un aumento en la expresión de proteínas relacionadas con apoptosis en las lesiones periféricas y centrales, así como las células gigantes son las que tiene actividad apoptótica y estas son muy probablemente las causantes de estas lesiones. Previamente Pammer et al. reportaron que la mayoría de las células gigantes fueron positivas para Bax y Bcl-2 tuvo una expresión débil en las células gigantes y fue negativo en células mononucleares. Considerando que estas lesiones son reactivas en lugar de una verdadera neoplasia. (49, 50).

## **6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Es conocido que el comportamiento clínico de las lesiones de células gigantes es incierto; ya que en algunas ocasiones pueden tener un crecimiento lento y asintomático; mientras que en otras ocasiones puede tener un comportamiento destructivo y con una alta morbilidad funcional. Por esto en la actualidad no se ha podido determinar su pronóstico con exactitud; y por lo tanto un tratamiento adecuado. Estudiar la función de las metaloproteinasas en la osteolisis de estas lesiones y las proteínas apoptóticas y antiapoptóticas en las células que las conforman podría contribuir a comprender el comportamiento agresivo de las lesiones centrales de células gigantes y realizar terapéuticas más eficaces.

## **7. JUSTIFICACIÓN**

El cirujano oral y maxilofacial se enfrenta a una disyuntiva cuando requiere determinar el tipo de tratamiento quirúrgico ya sea conservador o radical o la utilización de farmacoterapia con la finalidad de evitar la recurrencia de estas lesiones.

El paciente que presenta este tipo de lesiones requiere un seguimiento a largo plazo debido al comportamiento incierto por lo que el objetivo de este estudio es analizar si existe factores asociados al comportamiento agresivo que puedan determinar su comportamiento clínico incierto.

La destrucción ósea que existe en estas lesiones esta puede estar asociada a componentes de la matriz extracelular, específicamente las metaloproteinasas 1, 2, 3, 9 y 13 y que la apoptosis es una vía fundamental para la supervivencia de las células gigantes multinucleadas.

## **8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es la asociación entre la expresión de metaloproteinasas y proteínas apoptóticas/antiapoptóticas con el comportamiento agresivo de las lesiones de células gigantes de los maxilares?

## **9. HIPÓTESIS**

La expresión de metaloproteinasas y proteínas antiapoptóticas será mayor en las lesiones de células gigantes agresivas en comparación con las no agresivas.

## **10. OBJETIVO GENERAL**

Analizar la asociación entre la expresión de metaloproteinasas, proteínas apoptóticas y antiapoptóticas con el comportamiento agresivo de las lesiones de células gigantes de los maxilares.

## 11. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- \* Identificar los patrones de agresividad clínica y radiográficamente en lesiones de células gigantes centrales y periféricas.
- \* Describir el patrón de inmunexpresión de las metaloproteinasas en ambas lesiones.
- \* Describir la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bax en ambas lesiones.
- \* Comparar la expresión de las metaloproteinasas y las proteínas antiapoptóticas.
- \* Determinar las diferencias de expresión entre agresivos y no agresivos y centrales con periféricos.
- \* Determinar si existe asociación entre la expresión de MMPs y proteínas de apoptosis de acuerdo con su grado de agresividad y su localización.
- \* Determinar la expresión génica de las metaloproteinasas y proteínas de apoptosis en ambas lesiones.

## 12. MATERIAL Y MÉTODOS

### Diseño de estudio

Casos y controles, retrospectivo. Se definió como caso todas las lesiones identificadas como agresivas y controles las no agresivas.

### Población en estudio

Sesenta muestras incluidas en parafina de pacientes con diagnóstico de lesión de células gigantes central o periférica en maxilar o mandíbula obtenidos del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México” seleccionados de los archivos obtenidos de 1980 a 2017.

### Tamaño de la muestra

Se calculó un tamaño de muestra para dos proporciones independientes; obteniendo un total de 30 casos por grupo para detectar la máxima diferencia con un poder del 91% y un alfa de 0.05. En el grupo I se incluyeron 30 casos agresivos (casos) y en el grupo II casos no agresivos (control), incluyendo solo los casos que

tenían cubo de parafina con tejido suficiente para su procesamiento. Se buscó incluir la misma cantidad de periféricos como de centrales en cada grupo.

### **Criterios de selección**

#### *Criterios de Inclusión*

- Casos diagnosticados histopatológicamente lesión central o periférica de células gigantes.
- Casos que presenten tejido suficiente en embebidos en parafina para su procesamiento.
- Pacientes que firmen el consentimiento informado
- Pacientes con diagnóstico confirmado de lesión de células gigantes central o periférica y que cuenten con suficiente tejido embebido en bloques de parafina para ser procesados.

#### *Criterios de exclusión*

- Bloques de parafina que no contaron con tejido suficiente.
- Casos que no presenten datos clínicos en los expedientes sobre la agresividad de las lesiones.

#### *Criterios de eliminación*

- Casos que durante el procesamiento se perdió el tejido.

### **Variables (tabla 2)**

Tabla 2. VARIABLES	CONCEPTUAL	OPERACIONAL	CATEGORÍAS	ESCALA DE MEDICIÓN
<p><b>Lesión central de células gigantes</b></p> <p><b>Independiente</b></p>	<p>Tumoración intraósea de tipo reactivo, que afecta principalmente a huesos axilares y rara vez a otros huesos craneofaciales. Microscópicamente compuesta principalmente por numerosas células gigantes multinucleadas sobre un manto de células mesenquimales ovoidales y/o fusiformes con abundante vascularidad capilar con extravasación eritrocítica y acumulación de pigmento de hemosiderina(53).</p>	<p>Cuando en el expediente se refiera que es una lesión intraósea o se confirme por medio de una tomografía o radiografía panorámica alteraciones a nivel óseo.</p> <p>Histológicamente se diagnosticará cuando presente células gigantes multinucleadas en un manto de células mesenquimales ovoidales o fusiformes con abundante vascularidad y presencia de pigmento de hemosiderina.</p> <p>Se categorizarán como “agresivas” cuando se reporte o se observe clínicamente por lo menos uno de los siguientes criterios:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Crecimiento rápido</li> <li>- Dolor</li> <li>- Perforación de corticales</li> <li>- Reabsorción radicular de dientes adyacentes</li> <li>- Recurrencia</li> </ul> <p>Se categorizará como “no agresiva” cuando exista ausencia de todos los criterios descritos.</p>	<p>0. Agresivo 1. No agresivo</p>	<p>NOMINAL</p>
<p><b>Lesión periférica de células gigantes</b></p> <p><b>Independiente</b></p>	<p>Lesión periférica o épulis de células gigantes es una lesión histológicamente similar a la lesión central de células gigantes, la cual ocurre exclusivamente en encía o mucosa alveolar(53).</p>	<p>Cuando en el expediente se refiera que es una lesión periférica o se confirme por medio de una tomografía o radiografía panorámica la ausencia de alteraciones óseas.</p> <p>Histológicamente se diagnosticará cuando presente células gigantes multinucleadas en un manto de células mesenquimales ovoidales o fusiformes con abundante vascularidad y presencia de pigmento de hemosiderina.</p> <p>Se categorizarán como “agresivas” cuando se reporte o se observe clínicamente por lo menos uno de los siguientes criterios:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Crecimiento rápido</li> <li>- Erosión ósea</li> <li>- Desplazamiento de órganos dentales</li> <li>- Recurrencia</li> </ul> <p>Se categorizará como “no agresiva” cuando exista ausencia de todos los criterios descritos.</p>	<p>0. Agresivo 1. No agresivo</p>	<p>NOMINAL</p>
<p><b>MMP-1</b></p> <p><b>Dependiente</b></p>	<p>Metaloproteinasa de matriz 1 o colagenasa intersticial o colagenasa de los fibroblastos capaz de escindir el colágeno tipo I, II y III dando lugar al colágeno desnaturalizado o gelatina(54).</p>	<p>Inmunohistoquímica: Se tomarán como células positivas las que presenten tinción de color marrón a nivel citoplasmático.</p> <p>Electroforesis: Se considerará que el gen se ha expresado cuando en la fotodocumentación se observe el gel de color blanco.</p>	<p>0. Negativa 1. Positiva</p>	<p>NOMINAL DICOTÓMICA</p>
<p><b>MMP-2</b></p> <p><b>Dependiente</b></p>	<p>Gelatinasa que se encarga de degradar el colágeno desnaturalizado o gelatina(54).</p>	<p>Inmunohistoquímica: Se tomarán como células positivas las que presenten tinción de color marrón a nivel citoplasmático.</p>	<p>0. Negativa 1. Positiva</p>	<p>NOMINAL DICOTÓMICA</p>



		Electroforesis: Se considerará que el gen se ha expresado cuando en la fotodocumentación se observe el gel de color blanco.		
<b>MMP-3 Dependiente</b>	Estromalinas encargada de dirigir diversos componentes de la MEC y de la degradación de la membrana basal y de la MEC(54).	<p>Inmunohistoquímica: Se tomarán como células positivas las que presenten tinción de color marrón a nivel citoplasmático.</p> <p>Electroforesis: Se considerará que el gen se ha expresado cuando en la fotodocumentación se observe el gel de color blanco.</p>	<p>0. Negativa 1. Positiva</p>	NOMINAL DICOTÓMICA
<b>MMP-9 Dependiente</b>	Gelatinasa o metalopeptidasa 9, es un matrixinas, una clase de enzimas que pertenecen a la familia zinc-metaloproteinasas encarga de degradar el colágeno desnaturalizado o gelatina(54).	<p>Inmunohistoquímica: Se tomarán como células positivas las que presenten tinción de color marrón a nivel citoplasmático.</p> <p>Electroforesis: Se considerará que el gen se ha expresado cuando en la fotodocumentación se observe el gel de color blanco.</p>	<p>0. Negativa 1. Positiva</p>	NOMINAL DICOTÓMICA
<b>MMP-13 Dependiente</b>	Colagenasa capaz de escindir el colágeno tipo I, II y III dando lugar al colágeno desnaturalizado o gelatina(54).	<p>Inmunohistoquímica: Se tomarán como células positivas las que presenten tinción de color marrón a nivel citoplasmático.</p> <p>Electroforesis: Se considerará que el gen se ha expresado cuando en la fotodocumentación se observe el gel de color blanco.</p>	<p>0. Negativa 1. Positiva</p>	NOMINAL DICOTÓMICA
<b>Bcl-2 Dependiente</b>	Proteína de la familia bcl-2, inhibidora de la activación de las caspasas y la apoptosis, impidiendo la liberación de citocromo C por las mitocondrias(52).	<p>Inmunohistoquímica: Se tomarán como células positivas las que presenten tinción de color marrón a nivel citoplasmático.</p> <p>Electroforesis: Se considerará que el gen se ha expresado cuando en la fotodocumentación se observe el gel de color blanco.</p>	<p>0. Negativa 1. Positiva</p>	NOMINAL DICOTÓMICA
<b>Bax Dependiente</b>	Proteína promotora de la muerte celular de la familia bcl-2 con capacidad de desencadenar la apoptosis liberando citocromo C de las mitocondrias y activar las caspasas(52).	<p>Inmunohistoquímica: Se tomarán como células positivas las que presenten tinción de color marrón a nivel citoplasmático.</p> <p>Electroforesis: Se considerará que el gen se ha expresado cuando en la fotodocumentación se observe el gel de color blanco.</p>	<p>0. Negativa 1. Positiva</p>	NOMINAL DICOTÓMICA

## Metodología

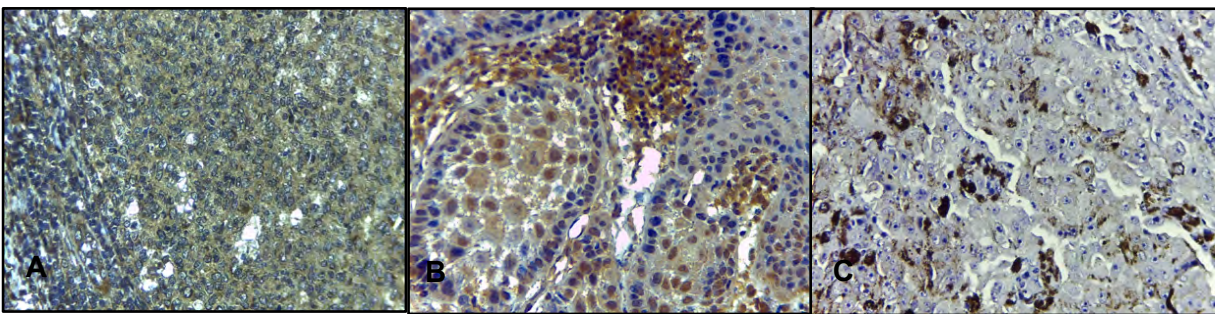
Se realizó revisión electrónica de carpetas de registro de lesiones de cabeza y cuello de 1982 a 2017 del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se obtuvo un total de 21,623 casos registrados; de éstos se seleccionaron 126 expedientes de pacientes con diagnóstico histopatológico de LCCG y LPCG que presentaron laminilla y cubo de parafina para su estudio de los cuales se incluyeron



30 casos para cada grupo. Se describieron sus características histológicas en laminillas teñidas con H&E con microscopio Leica DM2000. Las lesiones periféricas y centrales se clasificaron por su agresividad. Las LCCG se consideraron agresivas cuando se reportaban en los expedientes por lo menos una de las siguientes características clínicas o radiográficas: perforación o expansión de corticales, crecimiento rápido, reabsorción radicular, dolor y recurrencia. Mientras que en las LPCG agresivas se considero el crecimiento rápido, erosión ósea, desplazamiento de órganos dentarios, movilidad dental, dolor y recurrencia. Las no agresivas no debían de presentar ninguno de los criterios.

### Inmunohistoquímica (IHQ)

Se realizaron 7 cortes de 4 micras en laminillas electrocargadas para realizar inmunohistoquímica para los anticuerpos Bax, Bcl-2, MMP1, 2, 3, 9 y 13. Se estandarizó y realizó la técnica de inmunoperoxidasa. Los tejidos se desparafinaron con xilol y alcohol a diferentes concentraciones, se hizo la recuperación de antígenos con buffer de citratos, y lavados posteriores con PBS, se bloqueo la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno y el fondo inespecífico con albumina, realizando entre cada bloqueo lavados con PBS, la incubación del anticuerpo primario fue por 24hrs a 4°C; se lavo con PBS; posteriormente se incubo el anticuerpo secundario por 10min, HRP por 10min y se revelo con DAB (Bio SB, BSB 0007). El control positivo para Bax y Bcl-2 fue amígdala; para las metaloproteinasas fue carcinoma oral de células escamosas y melanoma (Figura 8).



Fuente Directa

**Figura 8** Fotomicrografías a 40x de controles positivos. **A** Inmunoreactividad de Bax en amígdala. **B** Inmunoreactividad de MMP-13 en un carcinoma oral de células escamosas. **C** Inmunoreactividad de MMP-2 en un melanoma.

Se tomaron 3 fotografías a 40x para cada anticuerpo con una cámara Nikon y microscopio LEICA. Se analizó la intensidad del marcaje por medio de su Densidad Óptica (OD) con el programa ImageJ 1.51. La OD se calibró de acuerdo a las siguientes categorías: nula, leve, moderada y severa (tabla 3).

**Tabla 3.** Categorías de la densidad óptica para cada anticuerpo.

Categoría	Densidad óptica (DO)						
	Bax	Bcl-2	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-13
<b>Nulo</b>	131	139	132	145	132	139	133
<b>Leve</b>	100	85	109	120	115	121	118
<b>Moderado</b>	79	61	95	110	100	104	93
<b>Severo</b>	58	40	68	90	85	93	81

Se realizó una prueba de chi-cuadrada para buscar asociación entre los casos positivos y la intensidad del marcaje con la agresividad de las lesiones.

### Expresión génica por RT-PCR

Se determinó la expresión génica de todos los casos positivos por lo menos a un anticuerpo de las 3 familias de las MMPs. Con un total de 12 casos agresivos y 7 no agresivos.

Se estandarizó la técnica de extracción de ARN total en una lesión central de células gigantes mandibular empleando el sistema ReliaPrep<sup>MT</sup> FFPE Total RNA Miniprep System (Promega, Madison WI) con aceite mineral como diluyente para desparafinar. Estandarizada la técnica se realizó la extracción de ARN total en todos los casos seleccionados. La cuantificación del ARN total fue por medio del NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, Rochester, NY) (tabla 4).

**Tabla 4.** Cuantificación de RNA total

No.	Caso	Ácido Nucleico ng/ $\mu$ l	Abs. 260/280
1	FO-124-84A	144.7	1.84
2	FO-060-87	97.9	1.91
3	FO-040-87A	128.3	1.93
4	FO-33-96A	176.1	1.94
5	FO-180A	168.4	1.92
6	FO-313-87A	96.9	1.93
7	FO-206-84	37.1	1.65
8	FO-734-93A	39.1	1.77
9	FO-476-93C	30.6	1.91
10	FO-405-93	43.6	1.91
11	FO-98-94A	53.6	1.95
12	FO-199-04	329.5	1.32
13	FO-154-83A	65.8	1.60
14	FO-815-98B	13.6	1.81
15	FO-253-87B	21.9	1.98
16	FO-521-98B	19.7	2.07
17	FO-244-85	28.6	1.93
18	FO-119-84B	34.4	1.66
19	FO-309-86	54.9	1.77

Por sugerencia del comité tutorial se excluyeron los casos con una relación de absorbancia menor a 1.7 (Abs. 260/280). Por lo que se incluyeron para para la técnica de RT-PCR un total de 15 casos (10 agresivos y 5 no agresivos).

Se estandarizó y realizó la técnica de RT-PCR con las siguientes secuencias de los primers previamente diseñados (tabla 5).

**Tabla 5.** Secuencia de Primers

MARCADOR	SECUENCIA	PESO DEL PRODUCTO bp
MMP1	s: GGTCTCTGAGGGTCAAGCAG a: AGTTCATGAGCTGCAACACG	207
MMP2	s: ACAGCAGGTCTCAGCCTCAT a: TGAAGCCAAGCGGTCTAAGT	151
MMP3	s: GCAGTTTGCTCAGCCTATCC a: GAGTGTCGGAGTCCAGCTTC	214
MMP9	s: TTGACAGCGACAAGAAGTGG a: GCCATTCACGTCGTCCTTAT	179
MMP13	s: TTGAGCTGGACTCATTGTCCG a: GGAGCCTCTCAGTCATGGAG	172
Bax	s: TTTGCTTCAGGGTTTCATCC a: CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA	246
BCL-2	s: GGATGCCTTTGTGGAAGTGT a: AGCCTGCAGCTTTGTTTCAT	236
GAPDH	s: ACCACAGTCCATGCCATCAC a: TCCACCACCCTGTTGCTGTA	231

Para la estandarización de las condiciones de termociclado y ensayo de la técnica se empleó RNA total obtenido de la lesión central de células gigantes con AMPIGENE 1-Step RT-PCR Kit (Enzo). Para determinar la temperatura de alineamiento se realizó la amplificación de GAPDH a 55, 57, 59, 61, 63 y 65°C con 3 diferentes concentraciones del ADNc (20ng/ml, 40ng/ml y 100ng/ml), obteniendo un mejor alineamiento a 61° C con 40 ng/ml.

Una vez estandarizada la técnica RT-PCR se realizó la amplificación para los 15 casos para cada uno de los primers bajo las siguientes condiciones (Tabla 6):

**Tabla 6.** Condiciones para la amplificación

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	55°C	10min.
1 ciclo	95°C	2min.
40 ciclos	95°C 61°C 72°C	10 seg. 10 seg. 60 seg.

Se visualizó la expresión génica por electroforesis (en un gel de agarosa al 2% con un buffer TAE 1x a 100Volts x 30min). Se utilizó como marcador de peso molecular PCR marker (Promega) de 1000, 750, 500, 300, 150 y 50pb. La fotodocumentación se realizó con el sistema GDS (Axygen, NY).

### 13. RESULTADOS

#### Inmunohistoquímica

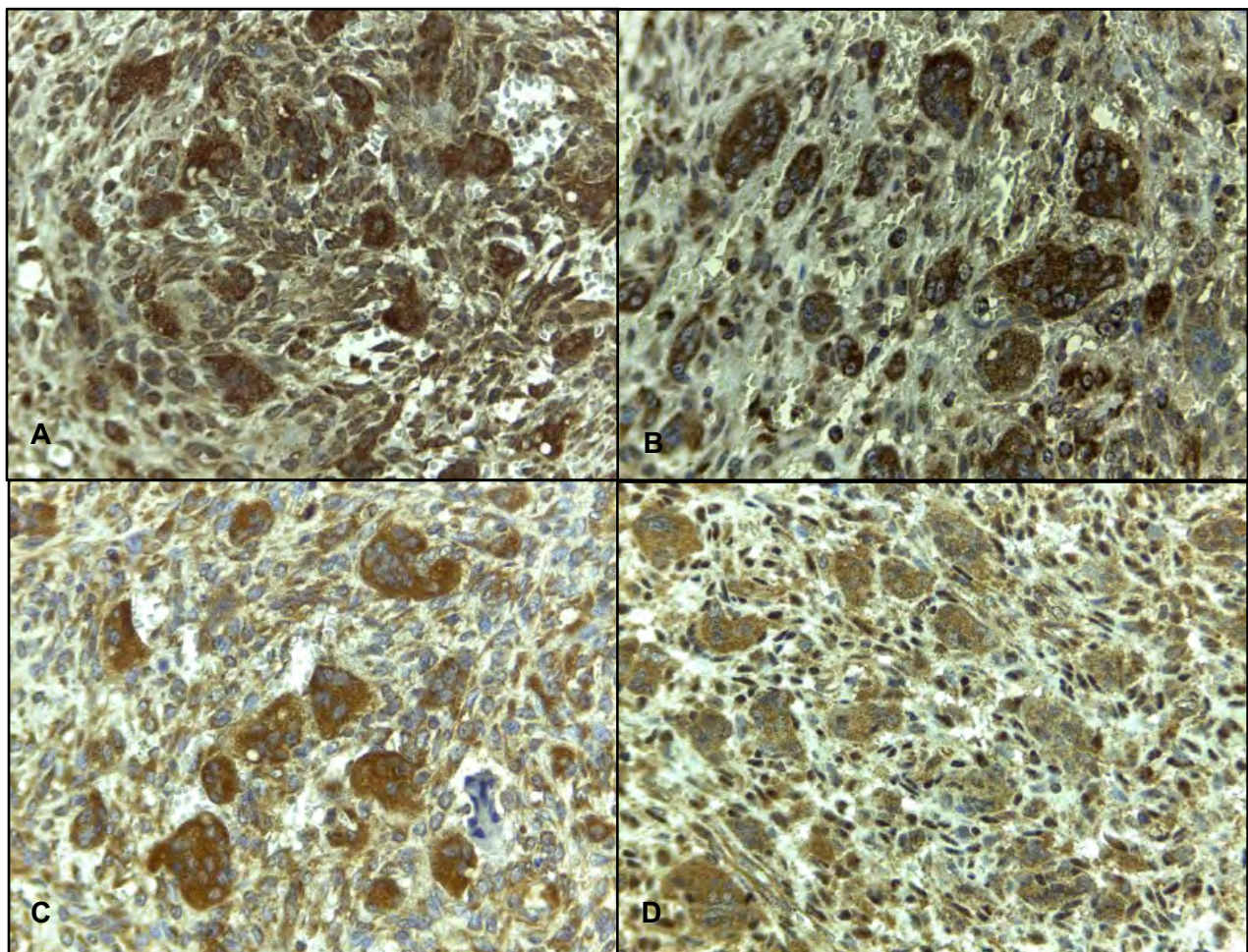
**Distribución de la positividad, intensidad del marcaje (DO) y agresividad.** *La MMP-9 fue positiva en 73.3% (n=11) de los casos agresivos p=0.03, la DO no presento significancia en ninguna metaloproteinasas, bax y bcl-2.*

*Bax* fue positivo en el 100% de los casos agresivos (grupo I) con DO leve de 13.3 %, moderada de 70% y severa de 16.7% y en los no agresivos (grupo II) fue positivo en 100% con una DO de 23.3%, 46.7% y 30% respectivamente (p=0.18). *Bcl-2* fue positivo en 100% en ambos grupos; la DO en el grupo I fue 0% nula, 53.3% leve, 33.3 moderado y 13.4% severo mientras que en el grupo II fue de 3.3%, 36.7%, 50% y 10% respectivamente (p=0.38) (Tabla 7 y 8 / figura 9).



**Tabla 7.** Distribución de positividad y agresividad.

Agresividad	BAX positivo n=60	Bcl2 Positivo n=60	MMP1 Positivo n=48	MMP13 Positivo n=19	MMP2 Positivo n=16	MMP9 Positivo n =15	MMP3 Positivo n=41
<b>No agresivo</b>							
N (%)	30 (100%)	30 (100%)	23 (47.9%)	7 (36.8%)	6 (37.5%)	4 (26.7%)	18 (45%)
<b>Agresivo</b>							
N (%)	30 (100%)	30 (100%)	25 (52.1%)	12 (63.2%)	10 (62.5%)	11 (73.3%)	22 (55%)
<b>Total</b>							
N (%)	60 (100%)	60 (100%)	48 (100%)	19 (100%)	16 (100%)	15 (100%)	40 (100%)
P			.52	.17	.24	.03	.27



Fuente Directa

**Figura 9** Fotomicrografías para inmunotinciones de Bax y Bcl-2. **A** Tinción citoplasmática de Bax en las CGM en una LCG agresiva y **B** en una LCG no agresiva. **C** Tinción citoplasmática de Bcl-2 en las CGM en una LCG agresiva y **C** en una no agresiva.

**Tabla 8.** Distribución de la intensidad del marcaje y agresividad para Bax y Bcl-2.

BAXExp	AGRESIVIDAD		Total
	No agresi	Agresivo	
Leve	7 23.33	4 13.33	11 18.33
Moderado	14 46.67	21 70.00	35 58.33
Severo	9 30.00	5 16.67	14 23.33
Total	30 100.00	30 100.00	60 100.00

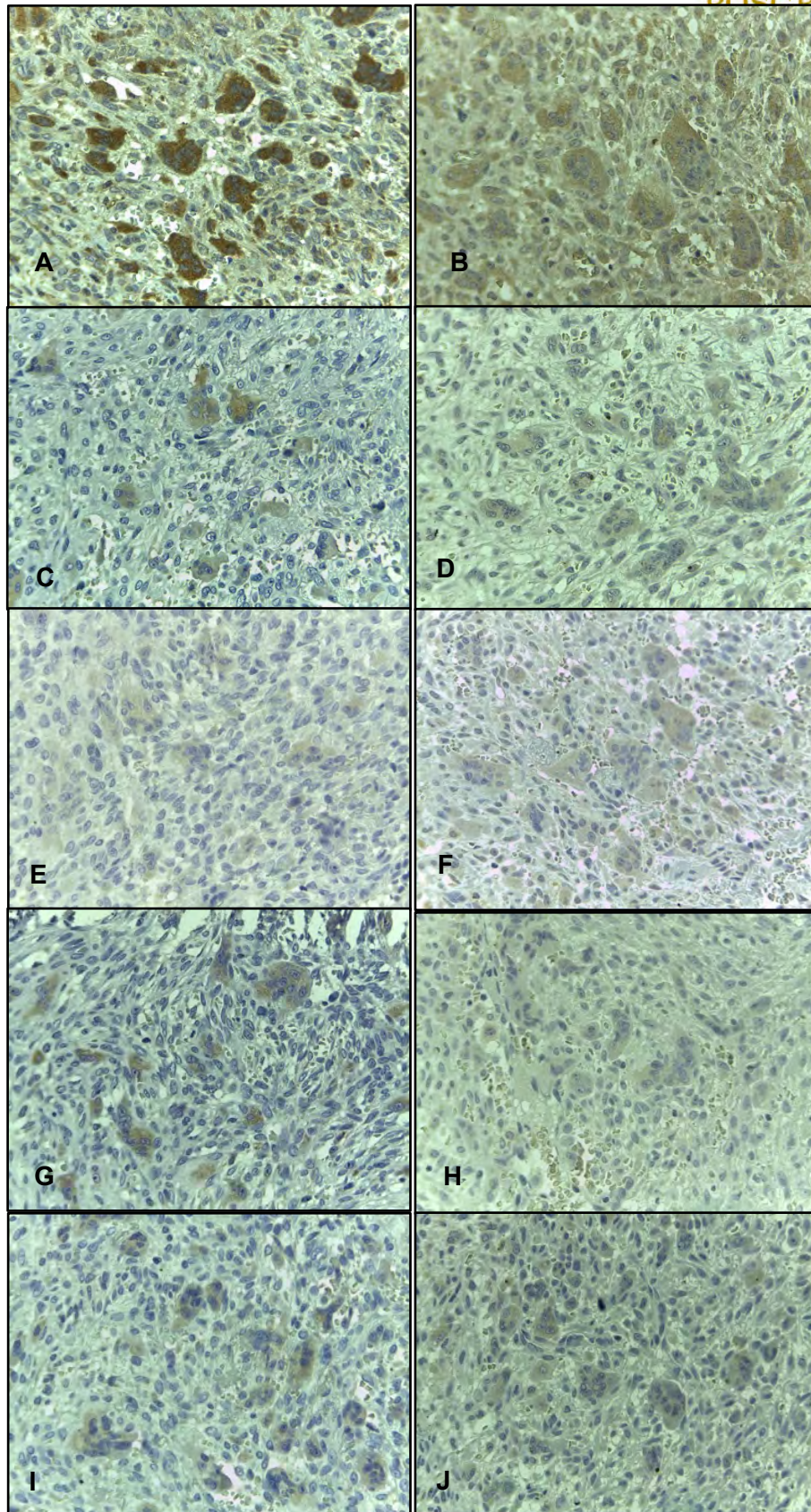
Pearson chi2 (2) = 3.3610 Pr = 0.186

Bcl2Exp	AGRESIVIDAD		Total
	No agresi	Agresivo	
Nulo	1 3.33	0 0.00	1 1.67
Leve	11 36.67	16 53.33	27 45.00
Moderado	15 50.00	10 33.33	25 41.67
Severo	3	4	7
Total	30 100.00	30 100.00	60 100.00

Pearson chi2 (3) = 3.0688 Pr = 0.381

La *MMP-1* en los casos agresivos fue positiva 52.1% y en los no agresivos 47.9% ( $p=.52$ ), la DO fue 16.7% nula, 20% leve, 33.3% moderada y 30% severa en el grupo I mientras que en el grupo II fue de 23.3%, 20%, 36.7% y 20% respectivamente ( $p=.80$ ). Para *MMP-2* fue positiva en el primer grupo 62.5%, mientras que en el otro grupo fue de 37.5% ( $p=.24$ ), la DO en el grupo de agresivos fue nula 66.7%, leve 13.3%, moderada 20% y severa 0%; en los no agresivos fue de 80%, 3.3%, 13.4% y 3.3% respectivamente ( $p=.31$ ). *MMP-3* fue positiva en los casos agresivos en 55% y en los no agresivos 45% ( $p=.27$ ), la DO en el primer grupo fue nula en 26.7%, leve 40%, moderada 26.7% y severa en 6.7%; en el segundo grupo fue de 40%, 6.6%, 46.7 y 6.7% respectivamente, se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p=.02$ ). La *MMP-9* presentó una DO en los casos agresivos nula de 63.3%, leve 23.3%, moderada 10% y severa de 3.4%; mientras que en los no agresivos fue de 86.7%, 3.3%, 10% y 0% respectivamente ( $p=.08$ ); su positividad en el primer grupo fue de 73.3% y en el segundo de 26.7% encontrando diferencias estadísticas significativas ( $p=.03$ ). Por último la *MMP-13* fue positiva en el grupo I con 63.2% y en el grupo II con 36.8% ( $p=.17$ ); la DO en el primer grupo fue nula en 60%, leve en 26.7%, moderada en 13.3% y severa en 0%; mientras que en el otro grupo fue de 76.7%, 10%, 13.3% y 0% respectivamente sin encontrar diferencias estadísticas significativas ( $p=.23$ ) (Tabla 7-9 / Figura 10). De los anticuerpos estudiados solo se encontró diferencia significativa en la positividad de *MMP-9*. No hubo diferencias en la DO para ningún anticuerpo.





Fuente Directa

**Figura 10** Fotomicrografías a 40x para inmunotinciones de MMP-1, 2, 3, 9 y 13. En la columna izquierda se muestra el Grupo 1 y en la derecha el grupo II. **A** Tinción citoplasmática de MMP-1, **C** MMP-2, **E** MMP-3, **G** MMP-9 y **I** MMP-13 en las CGM con una DO de moderada a severa . **B**, **D**, **F**, **H** y **J** Tinción citoplasmática MMP-1, 2, 3, 9 y 13 en las CGM con una DO de leve a moderada.



**Tabla 9.** Distribución de la intensidad del marcaje y agresividad para MMP-1, 2 3 9 Y 13.

MMP1Exp	AGRESIVIDAD		Total
	No agresi	Agresivo	
Nulo	7 23.33	5 16.67	12 20.00
Leve	6 20.00	6 20.00	12 20.00
Moderado	11 36.67	10 33.33	21 35.00
Severo	6 20.00	9 30.00	15 25.00
Total	30 100.00	30 100.00	60 100.00

Pearson chi2(3) = 0.9810 Pr = 0.806

MMP2Exp	AGRESIVIDAD		Total
	No agresi	Agresivo	
Nulo	24 80.00	20 66.67	44 73.33
Leve	1 3.33	4 13.33	5 8.33
Moderado	4 13.33	6 20.00	10 16.67
Severo	1 3.33	0 0.00	1 1.67
Total	30 100.00	30 100.00	60 100.00

Pearson chi2(3) = 3.5636 Pr = 0.313

MMP3Exp	AGRESIVIDAD		Total
	No agresi	Agresivo	
Nulo	12 40.00	8 26.67	20 33.33
Leve	2 6.67	12 40.00	14 23.33
Moderado	14 46.67	8 26.67	22 36.67
Severo	2 6.67	2 6.67	4 6.67
Total	30 100.00	30 100.00	60 100.00

Pearson chi2(3) = 9.5792 Pr = 0.023

MMP9exp	AGRESIVIDAD		Total
	No agresi	Agresivo	
Nulo	26 86.67	19 63.33	45 75.00
Leve	1 3.33	7 23.33	8 13.33
Moderado	3 10.00	3 10.00	6 10.00
Severo	0 0.00	1 3.33	1 1.67
Total	30 100.00	30 100.00	60 100.00

Pearson chi2(3) = 6.5889 Pr = 0.086

MMP13Exp	AGRESIVIDAD		Total
	No agresi	Agresivo	
Nulo	23 76.67	18 60.00	41 68.33
Leve	3 10.00	8 26.67	11 18.33
Moderado	4 13.33	4 13.33	8 13.33
Total	30 100.00	30 100.00	60 100.00

Pearson chi2(2) = 2.8825 Pr = 0.237

**Distribución de la intensidad del marcaje (DO) y agresividad de acuerdo con su localización.** *No se presentaron diferencias estadísticas significativas.*

Se obtuvieron 28 casos centrales y 32 periféricos. La DO de *Bax* fue leve en 13.3%, moderada en 73.3% y severa en 13.4% en los casos agresivos; mientras que en los no agresivos fue de 0%, 61.5% y 38.5% respectivamente (p=.16). Los periféricos la DO fue leve en 13.3%, moderada en 66.7% y severa en 20% en los casos agresivos;

mientras que en los no agresivos fue de 41.2%, 35.3% y 23.5% respectivamente ( $p=14$ ). *Bcl-2* en lesiones centrales fue leve en 66.7%, moderada en 20% y severa en 13.3% en los casos agresivos. En los no agresivos se presentó 23%, 53.9% y 23.1% respectivamente ( $p=.06$ ). En los periféricos agresivos fue nula %0, leve 40%, moderada 46.7% y severa 13.3%; los no agresivos fueron 5.9%, 47%, 47% y 0% respectivamente ( $p=.35$ ).

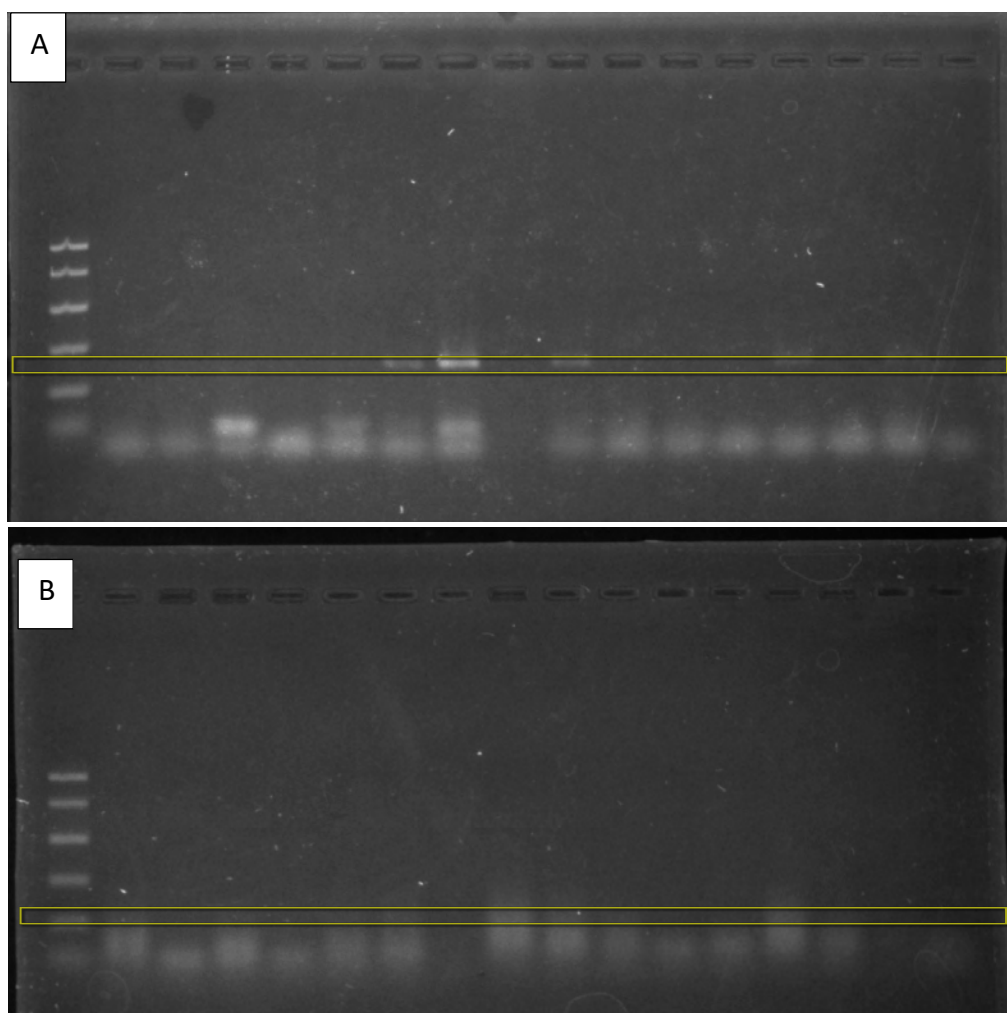
La intensidad del marcaje de *MMP-1* en centrales fue nula 26.7% leve 20%, moderada 33.3% y severa 20% en los casos agresivos; mientras que en los no agresivos fue de 30.8%, 30.8%, 38.5% y 0% respectivamente ( $p=.38$ ). Los periféricos la DO fue nula 6.7%, leve 20%, moderada 33.3% y severa 40% en los casos agresivos; mientras que en los no agresivos fue de 17.7%, 11.8%, 35.3% y 35.3% respectivamente ( $p=.76$ ). *MMP-2* en centrales fue nula 67.9% leve 20%, y moderada 13.3% en los casos agresivos; mientras que en los no agresivos fue de 69.2%, 7.7% y 23.1% respectivamente ( $p=.57$ ). Los periféricos la DO fue nula 66.7% leve 6.7%, moderada 26.7% y severa 0% en los casos agresivos; mientras que en los no agresivos fue de 88.2%, 0%, 5.9% y 5.9% respectivamente ( $p=.19$ ). *MMP-3* en centrales fue nula 26.7%, leve 40%, moderada 26.7% y severa 6.7% en los casos agresivos; mientras que en los no agresivos fue de 23.1%, 7.7%, 53.9% y 15.4% respectivamente ( $p=.19$ ). Los periféricos la DO fue nula 26.7%, leve 40%, moderada 26.7% y severa 6.7% en los casos agresivos; mientras que en los no agresivos fue de 52.9%, 5.9%, 41.2% y 0% respectivamente ( $p=.06$ ). *MMP-9* en centrales fue nula 60%, leve 26.7%, moderada 6.7% y severa 6.7% en los casos agresivos; mientras que en los no agresivos fue de 76.9%, 7.7%, 15.4% y 0% respectivamente ( $p=.38$ ). Los periféricos la DO fue nula 66.7% leve 20% y moderada 13.3% en los casos agresivos; mientras que en los no agresivos fue de 94.1%, 0% y 5.9% respectivamente ( $p=.10$ ). *MMP-13* en centrales fue nula 46.7%, leve 40% y moderada 13.3% en los casos agresivos; mientras que en los no agresivos fue de 69.2%, 7.7% y 23.1% respectivamente ( $p=.14$ ). Los periféricos la DO fue nula 73.3% leve 13.3% y moderada 13.3% en los casos agresivos; mientras que en los no agresivos fue de 82.3%, 11.8% y 5.9% respectivamente ( $p=.75$ ).

La distribución del marcaje y la agresividad de todos los anticuerpos no se asoció a una localización central o periférica.

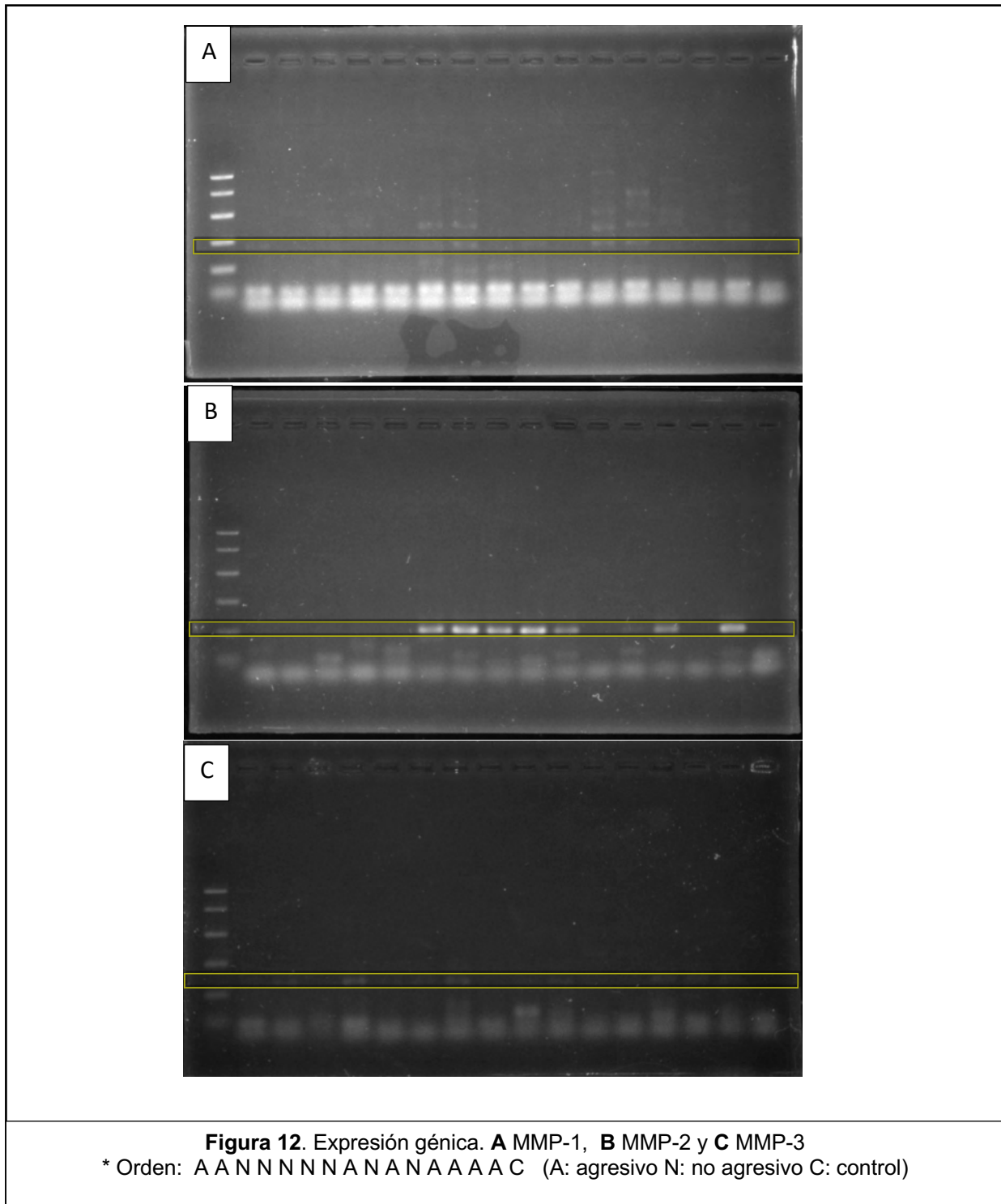
**Expresión Génica.** Se observó mayor expresión génica en los casos agresivos.

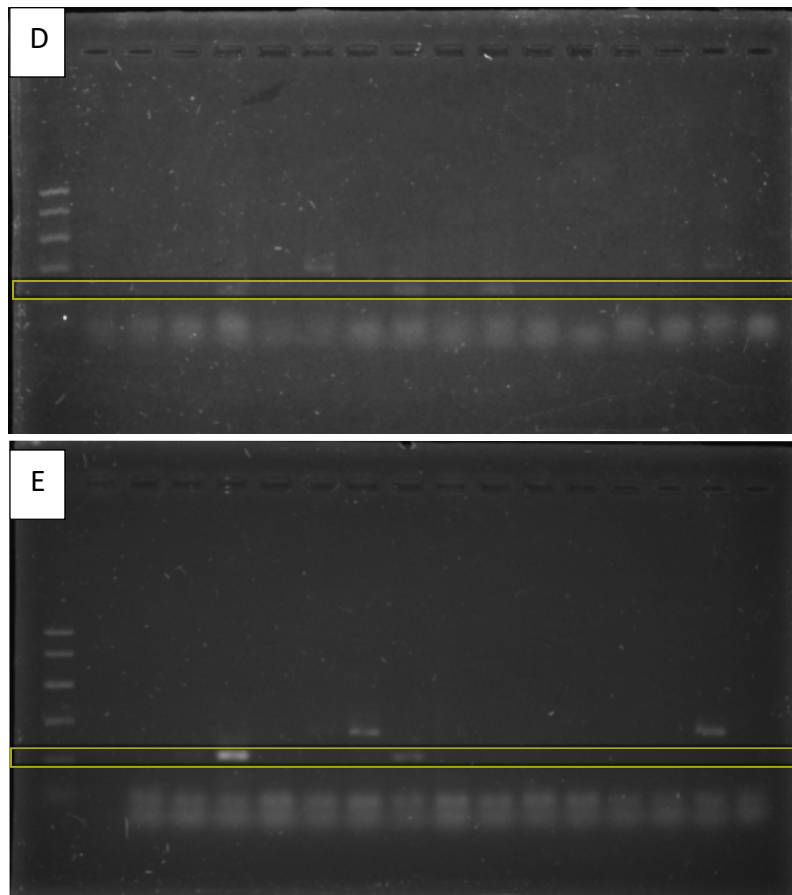
El gen para *Bcl-2* se expreso en 2 casos agresivos y 3 fueron no agresivos. *Bax* se expreso en 4 agresivos y 2 no agresivos (figura 11). Se expresaron los genes para todas las MMPs. El gen de *MMP-1* se expreso en 4 casos agresivos y 4 no agresivos, *MMP-2* en 4 agresivos y 3 no agresivos. *MMP-3* se expreso en 6 casos agresivos y 2 no agresivos. *MMP-9* se expreso en 3 agresivos y en ningún no agresivo y *MMP13* se expreso solo en 2 casos agresivos (figura 12 y 13).

De los genes analizados encontramos mayor expresión en todos los casos agresivos en comparación con los no agresivos.



**Figura 11.** Expresión génica. **A** *Bcl-2* y **B** *Bax*  
\* Orden: A A N N N N N A N A N A A A C A: agresivo N: no agresivo C: control)





**Figura 13.** Expresión génica. **D** MMP-9, **E** MMP-13  
\* Orden: A A N N N N A N A N A A A C (A: agresivo N: no agresivo C: control)

## 14. DISCUSIÓN

Los resultados de nuestro estudio mostraron que la DO leve a moderada de la *MMP-3* y la positividad de *MMP-9* se asociaron con mayor probabilidad de tener una lesión agresiva.

*Bcl-2* y *Bax* fueron positivas en todos los casos, la marca fue principalmente en el citoplasma de las CGM, la DO se comportó de forma similar en el grupo de agresivos y no agresivos. Se identificó el transcrito para ambos genes; estos resultados son similares a los reportados por Amaral et al. (49); sin embargo, no buscaron

asociación por agresividad. Con estos datos podríamos sugerir que la expresión de estas proteínas no está relacionada con la agresividad de las LCGs.

Todas las MMPs se expresaron citoplasmáticamente en las CGM y en algunas células estromales como fibroblastos. La *MMP-1* fue positiva de forma similar en ambos grupos y la DO no presentó significancia estadística; por lo que no encontramos asociación con la agresividad de esta metaloproteinasa; sin embargo, los resultados de Tobón-Arroyave et al. son diferentes, en su estudio encontraron mayor expresión de esta metaloproteinasa en las lesiones agresivas. Estas diferencias pueden deberse a que su estudio tenía menos casos no agresivos que agresivos. La positividad y la DO de la *MMP-2* no presentó asociación con la agresividad. Esta MMP no ha sido reportada en LCGs, se ha estudiado en queratoquistes y quistes radicales por Wahlgren et al. Ellos asociaron la expresión de esta MMP con la proliferación y migración de células epiteliales debido a que degrada los componentes de la MB (45). Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos diferencias, por lo que podemos sugerir que esta MMP no está asociada con la agresividad de las LCGs. La *MMP-3* no ha sido reportada en este tipo de lesiones. Nosotros encontramos que la *MMP-3* se expresa más en las lesiones agresivas con DO leve; mientras que en las no agresivas la DO es moderada ( $p=.02$ ). Está reportado que la MMP es encargada de degradar la MB y activar la MMP-9 (29, 42-47). Esto podría sugerir que a mayor DO de la *MMP-3* se activa la MMP-9 en los casos agresivos; por lo tanto, se podría asociar la expresión de *MMP-3* con la agresividad. Las LCGs agresivas positivas a *MMP-9* presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.03$ ). Tobón-Arroyave de forma similar a nuestros resultados encontró mayor expresión en casos agresivos (42). Con este resultado podríamos sugerir a la *MMP-9* como un indicador de agresividad y por lo tanto de mayor actividad osteolítica patológica. La *MMP-13* fue estudiada por Burgos et al. en lesiones periapicales por lo que asociaron su expresión a enfermedades inflamatorias del periodonto (55). Wahlgren encontró sobreexpresión de esta MMP en queratoquistes sugiriendo, su expresión puede explicar comportamiento agresivo (45). En nuestro estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas en su positividad y su DO; por lo que consideramos que su expresión no se asocia al comportamiento agresivo de estas lesiones.

Una de las fortalezas de este trabajo es haber estudiado la asociación de la expresión de MMPs con la agresividad de las lesiones de células gigantes y realizar una medición más objetiva del inmunomarcaje por medio de un programa estandarizado (imageJ®). Así mismo, podemos señalar que, entre las debilidades de este estudio es que no se utilizó un RT-PCR en tiempo real para medir con precisión el RNAm para cada gen. No encontramos respuesta a la posible



participación de la apoptosis en la determinación del grado de agresividad de las LCG.

## 15. CONCLUSION

No se observó asociación entre la agresividad y los marcadores de apoptosis Bax y Bcl-2. La MMP-3 y MMP-9 pueden considerarse como indicadores de riesgo para ayudar a determinar la agresividad en las lesiones de células gigantes.

## 16. PERSPECTIVAS

Se sugiere que se realicen más estudios que busquen biomarcadores que permitan determinar el grado de agresividad de las lesiones en una etapa temprana de presentación clínica; esto permitiría planificar tratamientos más oportunos, menos radicales y con mínima morbilidad.

## 17. REFERENCIAS

1. Motamedi MH, Eshghyar N, Jafari SM, Lassemi E, Navi F, Abbas FM, et al. Peripheral and central giant cell granulomas of the jaws: a demographic study. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2007;103(6):e39-43.
2. Reddy V, Saxena S, Aggarwal P, Sharma P, Reddy M. Incidence of central giant cell granuloma of the jaws with clinical and histological confirmation: an archival study in Northern India. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 2012;50(7):668-72.
3. Kruse-Losler B, Diallo R, Gaertner C, Mischke KL, Joos U, Kleinheinz J. Central giant cell granuloma of the jaws: a clinical, radiologic, and histopathologic study of 26 cases. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2006;101(3):346-54.
4. Maturana-Ramirez A, Adorno-Farias D, Reyes-Rojas M, Farias-Vergara M, Aitken-Saavedra J. A retrospective analysis of reactive hyperplastic lesions of the oral cavity: study of 1149 cases diagnosed between 2000 and 2011, Chile. *Acta odontologica latinoamericana : AOL*. 2015;28(2):103-7.

5. Dolanmaz D, Esen A, Mihmanli A, Isik K. Management of central giant cell granuloma of the jaws with intralesional steroid injection and review of the literature. *Oral and maxillofacial surgery*. 2016;20(2):203-9.
6. El-Naggar AK, Chan JKC, Rubin Grandis J, Takata T, Slootweg PJ. WHO classification of head and neck tumours: Lyon : International Agency for Research on Cancer, 2017  
4th edition; 2017.
7. Torabinia N, Razavi SM, Shokrolahi Z. A comparative immunohistochemical evaluation of CD68 and TRAP protein expression in central and peripheral giant cell granulomas of the jaws. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2011;40(4):334-7.
8. Amaral FR, Diniz MG, Bernardes VF, Souza PE, Gomez RS, Gomes CC. WWOX expression in giant cell lesions of the jaws. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2013;116(2):210-3.
9. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AC. *Oral and maxillofacial pathology*: St. Louis, Missouri : Elsevier, [2016]  
Fourth edition; 2016.
10. Rachmiel A, Emodi O, Sabo E, Aizenbud D, Peled M. Combined treatment of aggressive central giant cell granuloma in the lower jaw. *Journal of cranio-maxillofacial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2012;40(3):292-7.
11. Peacock ZS, Resnick CM, Susarla SM, Faquin WC, Rosenberg AE, Nielsen GP, et al. Do histologic criteria predict biologic behavior of giant cell lesions? *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2012;70(11):2573-80.
12. Auclair PL, Cuenin P, Kratochvil FJ, Slater LJ, Ellis GL. A clinical and histomorphologic comparison of the central giant cell granuloma and the giant cell tumor. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1988;66(2):197-208.
13. Razavi SM, Yahyaabadi R. Comparative Study of Correlation between Angiogenesis Markers (CD31) and Ki67 Marker with Behavior of Aggressive and Nonaggressive Central Giant Cell Granuloma with Immunohistochemistry Technique. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2018;19(8):2279-83.
14. Lester SR, Cordell KG, Rosebush MS, Palaiologou AA, Maney P. Peripheral giant cell granulomas: a series of 279 cases. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2014;118(4):475-82.
15. Jadu FM, Pharoah MJ, Lee L, Baker GI, Allidina A. Central giant cell granuloma of the mandibular condyle: a case report and review of the literature. *Dento maxillo facial radiology*. 2011;40(1):60-4.
16. Mullapudi SV, Putcha UK, Boindala S. Odontogenic tumors and giant cell lesions of jaws--a nine year study. *World journal of surgical oncology*. 2011;9:68.
17. Aghbali A, Sina M, Vahid Pakdel SM, Emamverdizadeh P, Kouhsoltani M, Mahmoudi SM, et al. Correlation of histopathologic features with demographic, gross and radiographic findings in giant cell granulomas of the jaws. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*. 2013;7(4):225-9.
18. Peacock ZS, Jordan RC, Schmidt BL. Giant cell lesions of the jaws: does the level of vascularity and angiogenesis correlate with behavior? *Journal of oral and*



maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. 2012;70(8):1860-6.

19. Koivisto T, Bowles WR, Rohrer M. Frequency and distribution of radiolucent jaw lesions: a retrospective analysis of 9,723 cases. *Journal of endodontics*. 2012;38(6):729-32.

20. Jamshidi S, Shojaei S, Roshanaei G, Modabbernia S, Bakhtiary E. Jaw Intraosseous Lesions Biopsied Extracted From 1998 to 2010 in an Iranian Population. *Iranian Red Crescent medical journal*. 2015;17(6):e20374.

21. Ahmad M, Gaalaas L. Fibro-Osseous and Other Lesions of Bone in the Jaws. *Radiologic clinics of North America*. 2018;56(1):91-104.

22. Kaplan I, Manor I, Yahalom R, Hirshberg A. Central giant cell granuloma associated with central ossifying fibroma of the jaws: a clinicopathologic study. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2007;103(4):e35-41.

23. Chandna P, Srivastava N, Bansal V, Wadhwan V, Dubey P. Peripheral and Central Giant Cell Lesions in Children: Institutional Experience at Subharti Dental College and Hospital. *Indian journal of medical and paediatric oncology : official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology*. 2017;38(4):440-6.

24. Bosca AB, Sovrea AS, Miclaus V, Ruxanda F, Miha CM, Melincovici CS, et al. Diagnostic and therapeutic approaches in oral cavity granulomas based on new data concerning their origin and pathogenesis. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2018;59(3):679-90.

25. Schutz P, El-Bassuoni KH, Munish J, Hamed HH, Padwa BL. Aggressive central giant cell granuloma of the mandible. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2010;68(10):2537-44.

26. Amaral FR, Brito JA, Perdigo PF, Carvalho VM, de Souza PE, Gomez MV, et al. NFATc1 and TNFalpha expression in giant cell lesions of the jaws. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2010;39(3):269-74.

27. Tobon-Arroyave SI, Franco-Gonzalez LM, Isaza-Guzman DM, Florez-Moreno GA, Bravo-Vasquez T, Castaneda-Pelaez DA, et al. Immunohistochemical expression of RANK, GRalpha and CTR in central giant cell granuloma of the jaws. *Oral oncology*. 2005;41(5):480-8.

28. Lee JM, Kim YJ. Foreign body granulomas after the use of dermal fillers: pathophysiology, clinical appearance, histologic features, and treatment. *Archives of plastic surgery*. 2015;42(2):232-9.

29. de Matos FR, de Moraes M, Nonaka CF, de Souza LB, de Almeida Freitas R. Immunoexpression of TNF-alpha and TGF-beta in central and peripheral giant cell lesions of the jaws. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2012;41(2):194-9.

30. Syrio NF, Faria DR, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO, Souza PE. IL-10 and IL-10 receptor overexpression in oral giant cell lesions. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2011;16(4):e488-92.

31. Chrcanovic BR, Gomes CC, Gomez RS. Central giant cell lesion of the jaws: An updated analysis of 2270 cases reported in the literature. *Journal of oral*

pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 2018;47(8):731-9.

32. Chuong R, Kaban LB, Kozakewich H, Perez-Atayde A. Central giant cell lesions of the jaws: a clinicopathologic study. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 1986;44(9):708-13.

33. Cowan RW, Singh G. Giant cell tumor of bone: a basic science perspective. *Bone*. 2013;52(1):238-46.

34. da Silva NG, Carreira AS, Pedreira EN, Tuji FM, Ortega KL, de Jesus Viana Pinheiro J. Treatment of central giant cell lesions using bisphosphonates with intralesional corticosteroid injections. *Head & face medicine*. 2012;8:23.

35. Etoz OA, Dolanmaz D, Gunhan O. Treatment of cherubism with salmon calcitonin: a case report. *European journal of dentistry*. 2011;5(4):486-91.

36. Fonseca FP, Ribeiro AC, Santos-Silva AR, Vargas PA, Lopes MA. Fine needle aspiration cytology and intralesional steroid injection in a central giant cell granuloma affecting the gingiva: a new clinical approach. *Brazilian dental journal*. 2013;24(4):420-7.

37. Bojan A, Christy W, Chanmougananda S, Ashokan K. Central Giant Cell Granuloma of the Jaw in Early Childhood: Surgical and Non-Surgical Management. *Journal of Advanced Oral Research*. 2012;3(2):26-9.

38. Nogueira RL, Teixeira RC, Cavalcante RB, Ribeiro RA, Rabenhorst SH. Intralesional injection of triamcinolone hexacetonide as an alternative treatment for central giant-cell granuloma in 21 cases. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2010;39(12):1204-10.

39. Ferretti C, Muthray E. Management of central giant cell granuloma of mandible using intralesional corticosteroids: case report and review of literature. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2011;69(11):2824-9.

40. Nogueira RL, Faria MH, Osterne RL, Cavalcante RB, Ribeiro RA, Rabenhorst SH. Glucocorticoid and calcitonin receptor expression in central giant cell lesions: implications for therapy. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2012;41(8):994-1000.

41. Gupta B, Stanton N, Coleman H, White C, Singh J. A novel approach to the management of a central giant cell granuloma with denosumab: A case report and review of current treatments. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2015;43(7):1127-32.

42. Tobon-Arroyave SI, Mideros-Simarra SM, Castano-Ramirez LM, Florez-Moreno GA, Isaza-Guzman DM. Overexpression of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and -9 in central giant cell lesions of the jaws: implications for clinical behavior. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2010;110(6):755-63.

43. Buzoglu HD, Unal H, Ulger C, Mert S, Kucukyildirim S, Er N. The zymographic evaluation of gelatinase (MMP-2 and -9) levels in acute and chronic periapical abscesses. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2009;108(5):e121-6.

44. Wang GW, Wang MQ, Wang XJ, Yu SB, Liu XD, Jiao K. Changes in the expression of MMP-3, MMP-9, TIMP-1 and aggrecan in the condylar cartilage of rats induced by experimentally created disordered occlusion. *Archives of oral biology*. 2010;55(11):887-95.
45. Wahlgren J, Vaananen A, Teronen O, Sorsa T, Pirila E, Hietanen J, et al. Laminin-5 gamma 2 chain is colocalized with gelatinase-A (MMP-2) and collagenase-3 (MMP-13) in odontogenic keratocysts. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2003;32(2):100-7.
46. Chang HH, Wu CB, Chen YJ, Weng CY, Wong WP, Chen YJ, et al. MMP-3 response to compressive forces in vitro and in vivo. *Journal of dental research*. 2008;87(7):692-6.
47. Matos FR, Nonaka CF, Miguel MC, Galvao HC, de Souza LB, Freitas Rde A. Immunoexpression of MMP-9, VEGF, and vWF in central and peripheral giant cell lesions of the jaws. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2011;40(4):338-44.
48. Maiz NN, de la Rosa-Garcia E, Camacho ME. Immunohistochemical expression of alpha-smooth muscle actin and glucocorticoid and calcitonin receptors in central giant-cell lesions. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2016;45(4):289-94.
49. Amaral FR, Bernardes VF, Duarte AP, Pereira NB, Vasconcelos AC, Gomez RS, et al. Quantitative expression analysis of apoptotic/antiapoptotic genes and association with immunolocalization of BAX and BCL-2 in peripheral and central giant cell lesions of the jaws. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2011;32(5):997-1003.
50. Pammer J, Weninger W, Hulla H, Mazal P, Horvat R. Expression of regulatory apoptotic proteins in peripheral giant cell granulomas and lesions containing osteoclast-like giant cells. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 1998;27(6):267-71.
51. Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, Iezzi G, Santinelli A. Prevalence of p53, bcl-2, and Ki-67 immunoreactivity and of apoptosis in normal oral epithelium and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2002;60(5):532-40.
52. Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Compendio de Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional*. Barcelona, SPAIN: Elsevier; 2012.
53. Meneses García A, Mosqueda Taylor A, Ruiz-Godoy Rivera LM. *Patología quirúrgica de cabeza y cuello : lesiones tumorales y pseudotumorales*. México: Trillas; 2006.
54. Coronato S. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. Laguens G, Di Girolamo V, editors 2012.
55. Mundi Burgos V, Dezerega Piwonka A, Osorio Alfaro C, Dutzan Muñoz N, Franco Martínez M, Ortega Pinto A, et al. Inmunodetección de metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs)-2, -9, -13 y -14 en lesiones apicales asociadas con

periodontitis apical asintomática. Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral. 2011;4:17-21.