



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
CURSO DE ODONTOLOGIA

Thiago Pires Claudio

Expressão da esclerostina na Displasia Fibrosa: correlação com dados patológicos

Florianópolis
2023

Thiago Pires Claudio

Expressão da esclerostina na Displasia Fibrosa: correlação com dados patológicos

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Gustavo Davi Rabelo, Dr.

Florianópolis

2023

Claudio, Thiago Pires

Expressão da Esclerostina na Displasia Fibrosa : correlação com dados patológicos / Thiago Pires Claudio ; orientador, Gustavo Davi Rabelo, 2023.

36 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Lesões Fibro-Ósseas Benignas. 3. Displasia Fibrosa. 4. Osso. 5. Esclerostina. I. Rabelo, Gustavo Davi. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Odontologia. III. Título.

Thiago Pires Claudio

Expressão da esclerostina na Displasia Fibrosa: correlação com dados patológicos

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Cirurgião Dentista e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 30 de outubro de 2023

Coordenação do Curso

Banca examinadora

Prof. Gustavo Davi Rabelo, Dr.

Orientador

Profa. Elena Riet Correa Rivero, Dra.

UFSC

Prof. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior, Dr.

UFSC

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Anne, por me proporcionar possuir todas as experiências que tive durante e me apoiar em todos os momentos da graduação e da vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Davi Rabelo, por todas as oportunidades, ensinamentos, esforços, correções e paciência que dedicou durante os quase dois anos me orientando.

Aos professores de patologia, Elena Riet, Liliane Grando, Felipe Daltoé, Filipe Daniel, Filipe Modolo, Rogério Gondak e Ricardo Albuquerque que, mesmo em situações desafiadoras de pandemia, fizeram eu me apaixonar por essa área, e continuam me inspirando a gostar ainda mais.

À Rieli, Karin e Kelli, que estiveram sempre por perto ajudando durante a confecção deste trabalho. Ao Laboratório de Patologia Bucal da UFSC, Gilmara e Manoela.

Aos meus amigos tanto os que eu fiz ao longo da graduação em Florianópolis, quanto os meus amigos de Balneário Camboriú, que, mesmo com um pouco de distância, sempre estiveram próximos.

Agradecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, Governo Federal - Brasil, pela disponibilização dos materiais de custeio utilizados no projeto, que faz parte de um macroprojeto contemplado no Edital Universal, Processo: 403656/2021-4.

RESUMO

A Displasia Fibrosa (DF) faz parte do grupo das lesões fibro-ósseas benignas (LFOBs) e é considerada uma alteração do desenvolvimento. Diversos mecanismos já foram explorados em relação a etiologia das LFOBs, mas pouco se sabe sobre o papel de proteínas ditas como específicas do osso no desenvolvimento e progressão destas lesões. A proteína esclerostina é considerada um regulador da remodelação óssea, sendo caracterizada como o mais potente inibidor da formação óssea. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a imunexpressão da esclerostina na DF e correlacionar com dados clínico-patológicos. Foi realizado um estudo transversal com biópsias do Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal (LPB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Cortes histológicos foram utilizados para análise histoquímica, visando a avaliação espacial das trabéculas ósseas presentes na lesão, e imunohistoquímica (IHQ) para avaliação da expressão da esclerostina. Lâminas coradas em Tricômico de Mallory foram avaliadas por um método semiautomatizado de segmentação das estruturas ósseas, seguida pela esqueletonização. A expressão da esclerostina foi avaliada da seguinte forma: imunolocalização das células marcadas e intensidade da marcação, seguida da classificação por scores. Também, foi obtido escore ponderado, sendo o valor dividido pela área tecidual analisada (mm^2). Depois da realização da IHQ, foi realizada outra técnica histoquímica, pela coloração em Azul de Toluidina. Dados clínicos dos pacientes foram obtidos das fichas de biópsias. Como resultados, foram avaliados ao todo 10 casos de DF, sendo 5 em pacientes do sexo masculino e 5 do sexo feminino. No total, 14 biópsias foram avaliadas nestes 10 indivíduos. As células marcadas para esclerostina estavam presentes no componente fibroso, mostrando um fenótipo semelhante aos mastócitos, com a marcação positiva do tipo *dots* ou grânulos, dispersos pelo citoplasma. Por vezes, era possível identificar que estas células marcadas estavam próximas aos espaços vasculares. Esta semelhança fenotípica com os mastócitos foi confirmada com a coloração de azul de toluidina, que revelou células com núcleo azulado e citoplasma arroxeadado, mostrando grânulos em diferentes tons variando do rosa ao arroxeadado. Ainda sobre a esclerostina, a maior parte das células positivas não estava em íntimo contato com o componente ósseo. Em algumas biópsias foi possível observar que as células marcadas, ora apresentavam-se dispersas de forma individual, ora formando pequenos *clusters*. As células marcadas foram vistas em ambos os tipos de conjuntivo, tanto àquele mais denso quanto mais frouxo. Dois casos mostraram positividade para osteócitos. Foi evidenciada a expressão da esclerostina em oito biópsias com score 0 (57,1%), seguido de uma biópsia com score 1 (7,1%), nenhuma com score 2 e 5 biópsias com score 3 (35,8%). Não houve correlação entre nenhum dos parâmetros relacionados à organização espacial trabecular e os escores da expressão da esclerostina. Conclui-se que a proteína esclerostina foi encontrada em aproximadamente metade dos casos de displasia fibrosa, principalmente no componente tecidual fibroso. As células positivas para expressão desta proteína revelaram morfologia semelhante à dos mastócitos, e em sua maioria, estavam com íntimo contato com os espaços vasculares e apresentaram-se ora individualmente, ora formando pequenos aglomerados.

Palavras-chave: Lesões Fibro-Ósseas Benignas; Displasia Fibrosa; Osso; Esclerostina.

ABSTRACT

Fibro-osseous lesions (FOLs) of the gnathic bones are characterized as a group of diseases with the substitution of the bone component by fibrous tissue. Fibrous Dysplasia (FD) is a developmental disease included in this group. Many mechanisms were already explored related to the etiology of these diseases, although little is known about the role of bone proteins in the development or progression of these lesions. Sclerostin is a protein considered a major regulator of bone remodeling, also known as the most potent inhibitor of bone formation. In this way, the aim of this study was to evaluate sclerostin immunoexpression in FD and to identify any correlations with the clinical-pathological data. A cross-sectional study was conducted on biopsies from the biobank of the Federal University of Santa Catarina. Histological sections were used for both histochemistry and immunohistochemistry. Histological slides were stained in Mallory trichrome for evaluation of the trabeculae spatial organization through a semi-automatic segmentation method for skeletonization. Sclerostin expression was analyzed, as follows: the location and number of positive cells, followed by the intensity of the immunostaining for score classification. In addition, a calibrated score was calculated and divided by the lesional area analyzed (mm²). A complementary stain with toluidine blue was also performed. Clinical data was obtained from the biopsy files. A total of 10 patients were evaluated, 5 male and 5 female, with a total of fourteen biopsies. Positive cells were found at the fibrous component, revealing a phenotypic similarity to the mast cells, with immunostaining revealing dots and granules within the cytosol. These positive cells were close to the vascular spaces. The phenotypic resemblance was confirmed by the toluidine blue stain revealing that the same positive cells showed a blue nucleus and a pinkish to purplish cytosol. Still, regarding the sclerostin expression, most of the positive cells were not in the vicinity of the bone component. These positive cells were found to be sometimes isolated and sometimes forming clusters in both fibrous stroma, dense and loose. Two cases revealed positivity for the osteocytes. Eight biopsies revealed no sclerostin expression (57.1%), followed by one with a score of 1 (7.1%), none with a score of 2, and 5 with a score of 3 (35.8%). There was no significant correlation between sclerostin expression and the trabeculae parameters. In conclusion, sclerostin was expressed in almost half of the cases of Fibrous Dysplasia, mostly at the fibrous stroma. The positive cells reveal a similar morphology to the mast cells, and most of them were in intimate contact with the vascular spaces, sometimes isolated and sometimes forming clusters.

Keywords: Fibrous-osseous lesions; Fibrous Dysplasia; Bone; Sclerostin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CR	Comprimento médio de ramo
GNAS1	Proteína ligante do nucleotídeo guanina, polipeptídeo 1 de atividade α -estimulante
H&E	Hematoxilina e Eosina
IHQ	Imuno-histoquímica
J	Junções
LFOBs	Lesões fibro-ósseas benignas
LPB	Laboratório de Patologia Bucal
LPR5/6	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 5/6</i>
Max.CR	Comprimento máximo de ramo
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
R	Ramos
Score_P	Score ponderado
TA	Temperatura ambiente
Tb	Trabécula
TCF/LEF	<i>T cell factor/lymphoid enhancer factor family</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	12
A.	LESÕES FIBRO-ÓSSEAS BENIGNAS E DISPLASIA FIBROSA.....	12
B.	DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DAS TRABÉCULAS ÓSSEAS.....	13
C.	ESCLEROSTINA.....	14
3.	OBJETIVOS.....	16
A.	OBJETIVO GERAL.....	16
B.	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	16
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
5.	RESULTADOS.....	21
6.	DISCUSSÃO.....	28
7.	CONCLUSÃO.....	31
8.	REFERÊNCIAS.....	32
	ANEXO 1 – ATA DA DEFESA.....	35
	ANEXO 2 – TRECHOS DO PARECER DO CEPESH/UFSC.....	36

1. INTRODUÇÃO

As lesões fibro-ósseas benignas (LFOBs) são categorizadas como um grupo de doenças que compartilham as mesmas características histológicas de substituição do tecido ósseo por um tecido conjuntivo fibroso entremeado por quantidades variáveis de tecido mineralizado (MAINVILLE et al., 2017). Embora as lesões do grupo das LFOBs possuam semelhança sobre as características histomorfológicas, as características clínicas são variadas e tratamento e prognóstico para estas condições são distintos e individualizados (NELSON; PHILLIPS, 2019).

A displasia fibrosa (DF), que se caracteriza como uma desordem óssea que pode resultar em deformidades esqueléticas causadas por uma mutação pós-zigótica no gene *GNAS1* (Proteína ligante do nucleotídeo guanina, polipeptídeo 1 de atividade α -estimulante). Esta condição pode ser classificada de duas formas, displasia fibrosa monostótica, onde a mutação acontece em fases mais tardias do desenvolvimento e acaba por afetar apenas um osso ou a displasia fibrosa poliostótica, onde neste caso, a mutação ocorre em fases mais iniciais do desenvolvimento e pode afetar múltiplos ossos do corpo, podendo também vir associada à síndrome McCune-Albright (BRANNON & FOWLER, 2001; NELSON & PHILLIPS, 2019).

As características clínicas observadas em pacientes com DF geralmente são: aumento de volume indolor do osso afetado, podendo causar assimetria facial. Na avaliação intraoral, a tumefação geralmente apresenta-se recoberta por mucosa íntegra. A doença não possui predileção por sexo biológico dos pacientes afetados. O aumento de volume pode manifestar-se de forma mais contida, como também pode atingir proporções maiores, causando agravos das estruturas acometidas e dos tecidos adjacentes (NELSON; PHILLIPS, 2019; NEVILLE et al., 2016). Os ossos do complexo estomatognático, principalmente mandíbula e maxila, é a mais acometida, em especial a maxila.

Com o intuito de entender melhor a lesão, é necessário interpretar os aspectos radiográficos, clínicos e patológicos, principalmente para o cirurgião dentista clínico e para o patologista. Nos exames de imagem, a condição apresenta um aspecto clássico de “vidro despolido” ou opacidade nas radiografias, não apresenta limites bem definidos, e pode vir acompanhada da perda da lâmina dura e espessamento do ligamento periodontal, e em fases mais iniciais da lesão, pode apresentar radiolucidez como a sua principal característica. Pode, também, causar deslocamento dental ou de outras estruturas no decorrer do seu tempo de

evolução (NELSON; PHILLIPS, 2019; NEVILLE et al., 2016; RICALDE; MAGLIOCCA; LEE, 2012).

Frente às mudanças encontradas nos exames de imagem, juntamente com as repercussões clínicas, os casos de DF dos ossos maxilares merecem especial atenção, e por isso, faz-se necessário entender como as mudanças ósseas acontecem, uma vez que os aspectos radiográficos estão diretamente relacionados com as mudanças no osso, incluindo alterações em termos estruturais e de composição. A remodelação e modelação óssea são processos complexos e que compreendem inúmeras sinalizações locais e/ou sistêmicas, que direcionam o comportamento celular para produção e/ou ativação de proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo. A esclerostina é uma glicoproteína expressa majoritariamente pelo osteócito, que compreende mais de 90% da população celular do osso. Este tipo celular apresenta funções de regulação da matriz óssea, orquestrando as demais células e suas funções. A esclerostina possui ação antagonista para com a via de sinalização Wnt/beta-catenina, inibindo a formação óssea. Assim, quando há níveis baixos de esclerostina, os níveis de formação óssea são elevados, e assim, pode-se acabar por reduzir também os níveis de reabsorção óssea (BARON; RAWADI, 2007b; MADEIRA et al., 2019; PELLETIER et al., 2015).

Em suma, a DF se caracteriza principalmente pela substituição do tecido ósseo saudável por um tecido conjuntivo fibroso e osso anormal, dessa forma, pode-se levantar a hipótese de que a existência de alguma proteína óssea poderia ser responsável por parte dos mecanismos envolvidos nesta substituição tecidual. Como a esclerostina possui função principal de inibir a formação óssea, sugere-se que esta possa estar envolvida em alguma das vias de sinalização que ocorrem na patogênese e progressão da DF. Sendo assim, este estudo tem como objetivo analisar a presença da proteína esclerostina na DF e averiguar se sua expressão pode estar correlacionada com alguma das características clínico-patológicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A. LESÕES FIBRO-ÓSSEAS BENIGNAS E DISPLASIA FIBROSA

As lesões fibro-ósseas benignas são agrupadas desta forma em virtude das suas características de substituição do tecido ósseo por uma matriz de tecido conjuntivo fibroso, que geralmente aparece entremeada de quantidades variáveis de tecido mineralizado. As lesões que fazem parte desse grupo são: a) mais comuns: displasia cemento-óssea; displasia fibrosa; fibroma ossificante psamomatóide; fibroma ossificante trabecular juvenil; b) menos comuns: displasia odontomaxilar segmental e cementoma gigantiforme familiar (VERED E WRIGHT, 2022). Embora as lesões estejam contidas em um único grupo, as características clínico-radiográficas e histológicas são necessárias para um diagnóstico definitivo pois estas lesões possuem prognósticos e tratamentos distintos (MACDONALD-JANKOWSKI, 2004; NEVILLE et al., 2016).

A DF é uma desordem que pode apresentar-se de formas clínicas diferentes, a poliostótica, que afeta múltiplos ossos, e a monostótica, apenas um osso. A DF poliostótica é vista em menor frequência comparada a monostótica, além de, quando poliostótica, os pacientes podem apresentar pigmentações “café-com-leite” em pele e desordens endócrinas, sendo a DF inclusa como achado da Síndrome de McCune Albright. Os ossos do complexo gnático podem ser acometidos em ambas as formas da doença. A DF é resultado de uma mutação no gene *GNAS* (20q13.32), podendo ocorrer nas etapas mais tardias do desenvolvimento ou não, o que ditará a apresentação clínica. Mutação em estágios mais prévios do desenvolvimento acarretam condições mais severas e distribuídas pelos ossos (poliostótica), já a mutação em estágios mais tardios acaba por afetar apenas um osso (EL-MOFTY, 2014; NEVILLE et al., 2016; DICAPRIO, 2005).

A DF, por tratar-se de uma lesão caracterizada por um crescimento expansível e indolor dos ossos, é geralmente descoberta em radiografias de rotina nos casos mais incipientes e recentes, e grandes tumefações que podem causar assimetria facial nos pacientes ficam evidentes clinicamente no exame físico extraoral. Todavia, se esse crescimento tornar a comprometer algumas áreas anatômicas, podem ocorrer sintomas como: dores de cabeça, obstrução nasal, perda da audição ou da visão. Geralmente a maxila é mais afetada, além de manifestar-se entre a primeira e segunda década de vida do paciente. Já suas peculiaridades radiográficas são variáveis dependendo do estágio da lesão, em fases mais iniciais a lesão possui aspecto mais radiolúcido e com algum tempo de evolução, a lesão pode apresentar um

aspecto de “vidro despolido/fosco”, sem delimitações bem definidas na radiografia (EL-MOFTY, 2014; EVERSOLE; SU; EL-MOFTY, 2008; HAMEED et al., 2020).

Os aspectos histopatológicos da DF revelam trabéculas ósseas irregulares, presença de osso neoformado de aspecto curvilíneo que muitas vezes acabam por não apresentar conexões entre si e que se encontra desorganizado e permeado por um estroma de tecido conjuntivo fibroso, podendo ser altamente ou pouco celularizado. Este aspecto é denominado pelos patologistas como “sopa de letrinhas” ou “caracteres chineses”. Estruturas mais mineralizadas também podem ser encontradas no tecido lesional, todavia, em poucas quantidades (HAMEED et al., 2020; NEVILLE et al., 2016).

O tratamento da DF é complexo e pode incluir tanto manobras mais conservadoras quanto radicais. Para a região craniofacial, a escolha do tratamento é fundamentada na melhoria da qualidade de vida e devolução de funcionalidade ao paciente, levando-se em conta alguns critérios como: idade do paciente, extensão e o comportamento clínico/evolução da lesão e a maturidade esquelética do indivíduo. A relação do tratamento com a idade deve-se, pois, a doença tende a estabilizar-se quando há maturação esquelética do indivíduo, entretanto algumas lesões podem continuar seu crescimento (ABRAMOVITCH; RICE, 2016; NEVILLE et al., 2016). O tratamento pode envolver o monitoramento clínico e de imagem da lesão, juntamente a uma equipe multiprofissional. Lesões menores, que não abrangem estruturas anatômicas essenciais, podem ser ressecadas cirurgicamente em sua porção total, entretanto, lesões extensas e que possuem contato com estruturas vitais é sugerido fazer uso da osteoplastia e acompanhamento clínico e radiográfico para averiguar se haverá novo crescimento (BURKE; COLLINS; AM BOYCE, 2016).

B. DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DAS TRABÉCULAS ÓSSEAS

A distribuição espacial do componente ósseo da DF dá-se de maneira incomum por tratar-se de uma patologia. Todavia, a presença do tecido ósseo denota a possibilidade de avaliar a microarquitetura do constituinte lesional, possibilitando o conhecimento de padrões ocasionados pela substituição do tecido normal pelo patológico (CHAPPARD; BASLÉ; LEGRAND; AUDRAN, 2008). Características clínicas, imaginológicas e marcadores bioquímicos são utilizados nos diagnósticos de lesões e avaliação da efetividade de condutas terapêuticas. Ainda assim, métodos como a histomorfometria óssea, em casos específicos, acabam por ser o padrão-ouro para conhecimento do osso no nível tecidual e celular (CHAVASSIEUX; CHAPURLAT, 2022).

A distribuição espacial das trabéculas ósseas pode ser analisada pela histomorfometria, tendo em vista a possibilidade de analisar parâmetros como: número de trabéculas e a interconectividade entre elas (HOF; ROSE; BASSONGA; DAROSZEWSKA, 2017). Analisar, em imagens bidimensionais, quanto anastomosadas e interconectadas estão as trabéculas é importante, pois sabe-se que em inúmeras doenças a perda da interconectividade trabecular é um achado frequente, na maior parte das vezes relacionado a um processo de reabsorção óssea intenso. Na análise histomorfométrica, o uso de softwares que permitem a avaliação métrica, como o Fiji/ImageJ, deve ser encorajado. Diversas ferramentas podem auxiliar na avaliação trabecular, sendo uma delas, a esqueletonização, que permite obter um esqueleto linear representativo das trabéculas por meio do processamento da imagem pela binarização (SILVA; VENÂNCIO; LOURES; LOPES; DECHICHI; RABELO, 2019). O processamento da imagem e a posterior esqueletonização permite a avaliação de imagens advindas de lâminas histológicas, tornando possível a mensuração de trabéculas e seus respectivos ramos e junções (DOUBE et al., 2010).

C. ESCLEROSTINA

A esclerostina é uma glicoproteína produto do gene SOST, que se encontra no braço longo do cromossomo 17, na região 2, banda 1, sub-banda 31. A proteína é expressa principalmente por osteócitos, entretanto, existem diversas outras células capazes de expressar esclerostina, sendo por condições de normalidade ou de doença (WEIVODA; YOUSSEF; OURSLER, 2017). Pesquisas já avaliaram a expressão gênica para mRNA na mandíbula, evidenciando que existe sinal para expressão dessa proteína nos ossos maxilares (RABELO; COUTINHO-CAMILLO; KOWALSKI; PORTERO-MUZY; ROUX; CHAVASSIEUX; ALVES, 2017). De forma resumida, a esclerostina caracteriza-se por ser uma proteína considerada o mais potente inibidor da formação óssea, pois regula negativamente a via de sinalização canônica Wnt (BARON; RAWADI, 2007).

A via Wnt exerce função importante na regulação da embriogênese e homeostase tecidual por sua função no controle da proliferação, polaridade, diferenciação celular e manutenção de células-tronco (MARINI; GIUSTI; PALMINI; BRANDI, 2022). A via canônica possui ação na osteogênese pelos efeitos nas células-tronco mesenquimais, promove a linhagem osteoblástica e inibe a diferenciação de osteoclastos (OMRAN; ATANASOVA; LANDGREN; MAGNUSSON, 2022).

Os receptores Frizzled e LRP5/6 encontram-se presentes na membrana celular, aos quais a proteína Wnt liga-se, fazendo com que ocorra um impedimento da degradação e favorecendo um acúmulo de β -catenina no interior da célula. A β -catenina então transloca-se ao núcleo e é ligada aos fatores de transcrição TCF/LEF e então iniciando a transcrição dos genes. A esclerostina acaba se ligando-se aos receptores LPR4 e LPR5/6, inibindo a ligação da proteína Wnt, então, ocorre a fosforilação da β -catenina e a sua degradação pelo proteossoma, não mais permitindo sua migração ao núcleo e o desencadeamento da sua ação como fator indispensável para transcrição de alguns genes (KRISHNAN, 2006; OMRAN; ATANASOVA; LANDGREN; MAGNUSSON, 2022).

Estudos mostram a presença de alterações na expressão do gene SOST e esclerostina em condições patológicas como artrite e espondilite anquilosante (APPEL et al., 2009; ROUDIER et al., 2013). Por ter um papel central na formação óssea, já foi desenvolvido um anticorpo monoclonal anti-esclerostina, que está sendo comercializado para o manejo de pacientes com osteoporose grave, denominado Romosozumab, que atua neutralizando a atividade da esclerostina (LIM; BOLSTER, 2017).

3. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GERAL

Analisar a imunexpressão da esclerostina na displasia fibrosa e sua correlação com aspectos patológicos da doença.

B. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Avaliar a imunexpressão da esclerostina em casos de displasia fibrosa advindos do Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal (LPB) da UFSC.
- 2) Avaliar a distribuição espacial das trabéculas no osso lesional e perilesional das displasias fibrosas, utilizando método computacional semiautomatizado por meio da esqueletonização.
- 3) Verificar se existe correlação entre os resultados da imunexpressão da esclerostina com dados patológicos, incluindo os achados da avaliação trabecular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada uma análise retrospectiva de casos do acervo do biobanco do Laboratório de Patologia Bucal (LPB), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O LPB dispõe de um montante de biópsias de pacientes, assim como suas fichas e laudos clínicos, onde são apresentadas as características das lesões, identificação do paciente e descrição histológica da lesão. A triagem dos blocos foi realizada de acordo com o diagnóstico histológico dado pelo patologista, sendo selecionados aqueles que foram descritos como “Lesão Fibro-Óssea Benigna” ou “Displasia Fibrosa” e que possuísem material biológico suficiente para realizar a análise histológica e de imunohistoquímica. O projeto faz parte de um macroprojeto intitulado “Processamento de imagens na avaliação de lesões ósseas orais”, coordenado pelo orientador desta pesquisa, registrado no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos institucional sob número de CAAE 28234620.0.0000.0121 e aprovado com parecer de número 4.063.334.

Após a seleção e separação dos blocos, foram obtidos cortes histológicos para a técnica de imunohistoquímica (IHQ) para proteína esclerostina e técnica histoquímica pela coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E), Tricrômico de Mallory e azul de toluidina. Foram feitos cortes histológicos de 3 micrômetros (μm) de espessura e montados em lâminas de vidro previamente silanizadas para IHQ e lâminas de vidro convencionais para H&E e Tricrômico de Mallory. Para a reação de IHQ, controles positivos e negativos foram utilizados em cada rodada de coloração, sendo: fígado de rato e fígado humano usados como controle positivo, como sugerido pelo fabricante e para os controles negativos houve a dispensa do uso do anticorpo primário nos cortes.

Para a reação de IHQ para esclerostina as lâminas foram imersas em Xilol em temperatura ambiente (T.A.) previamente ao primeiro dia das reações. Em sequência, foi realizado 1 banho de 20 minutos em Xilol T.A., e realizado o processo de reidratação do tecido com 3 banhos de 5 minutos em álcool etílico absoluto, 1 banho de 5 minutos em álcool etílico 95% e 1 banho em álcool etílico 85%. Em seguida, 2 banhos de 5 minutos em água destilada foram realizados. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado em ambiente escuro, com 2 banhos de 20 minutos em uma solução de peróxido de hidrogênio a 6%. Após essa reação, foi realizado 1 banho de 5 minutos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e um banho de 5 minutos em água destilada. Para a recuperação antigênica as lâminas foram submersas em solução Tampão citrato 0,01M, pH 6,0 em uma temperatura constante de 96°C por 40 minutos. Após o resfriamento da solução foram feitos 2 banhos de 5 minutos

cada em PBS. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com uma solução de leite desnatado a 5% em PBS com o tempo de incubação de 40 minutos. Depois, foram realizados 2 banhos de 5 minutos em solução de PBS e as lâminas foram demarcadas com caneta hidrofóbica ao redor dos cortes histológicos para incubação do anticorpo primário. Um volume de 50µL foi pipetado em cada corte histológico em uma concentração de 1:300 (anticorpo:PBS) A incubação do anticorpo primário deu-se *overnight* em câmara úmida em temperatura de 4 a 8°C.

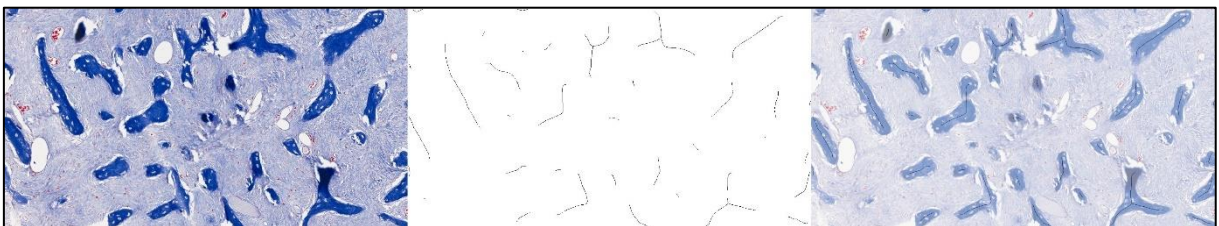
Ao segundo dia de reação, foram realizados 2 banhos de 5 minutos em PBS e incubação com o anticorpo secundário (Envision) em cada corte por um período de 1 hora e 15 minutos em T.A. e 2 banhos de 5 minutos em PBS. As reações foram reveladas em uma solução de diaminobenzidina (DAB, Dako) por 5 minutos em ambiente de baixa iluminação. Após, 1 banho de 5 minutos em água destilada foi realizado e os cortes foram contra-corados em Hematoxilina de Harris por 6 minutos. Em seguida, foi realizada a lavagem do excesso de hematoxilina em água corrente. A remoção do pigmento formólico deu-se por uma rápida imersão em solução aquosa de hidróxido de amônia 1% e lavou-se imediatamente por 2 minutos em água corrente. A desidratação ocorreu por 1 banho de 5 minutos em álcool etílico 85%, 1 banho de 5 minutos em álcool etílico 95% e 3 banhos de álcool etílico absoluto. Diafanização foi performada com 2 banhos em xilol por um período de 20 minutos e após isso foi feito a montagem da lamínula com Entellan nas lâminas.

Após essa etapa, as lâminas foram digitalizadas em um aumento de 400x usando Pannoramic 250 whole slide scanner (3DHistech, Budapest, Hungary). No componente ósseo e fibroso de cada lesão, a expressão foi avaliada de acordo com a marcação/coloração: 1) se nuclear e/ou citoplasmática; 2) se forte, moderada ou fraca. Em uma segunda avaliação, a marcação foi avaliada pela porcentagem de células imuno-positivas, e foram usados os seguintes escores: 0 (<1%); 1 (1-24%); 2 (25- 49%); 3 (50-74%); e 4 (75-100%).

As lâminas coradas pelo Tricrômico de Mallory também foram escaneadas para a avaliação histomorfométrica. O corante possui a característica de apresentar uma predominância de coloração vermelha para um tecido ósseo lamelar e coloração azul para o tecido ósseo neoformado/imaturo. Como em um estudo prévio da mesma equipe deste trabalho foram criados dois códigos computacionais para automatização da esqueletonização em imagens histológicas de lesões fibro-ósseas (Zanotto et al., dados ainda não publicados), que foram padronizados para uso no software Fiji/ImageJ, optou-se por utilizar o mesmo protocolo nas imagens da DF deste estudo. Resumidamente, os códigos possuem base na divisão de cores pelo sistema RGB (vermelho, verde e azul, do inglês *red, green, blue*). A

partir da coloração predominante (vermelha ou azul) em cada lâmina as imagens foram separadas em duas pastas diferentes. Imagens que possuíam tecido com predominância lamelar (coloração vermelha) foram processadas pelo código com exclusão dos canais *red* e *green* e, o osso imaturo (coloração azul) foi processado utilizando o código com exclusão dos canais *blue* e *green*. Então, as imagens foram binarizadas e processadas para esqueletonização usando as opções “*none*”, “*prunning method*” e “*Prune ends*” para todas as imagens processadas (Figura 1). Os códigos estão disponibilizados em domínio público na plataforma Github no perfil do “*Open Dentistry*” (disponível em: https://github.com/ricardocaldas/opendentistry/tree/main/zanotto_skeletonization).

Figura 1 – Processo de esqueletonização. Imagem original corada em Mallory, ao centro, a imagem esqueletonizada, e na imagem à esquerda, uma sobreposição da imagem esqueletonizada na imagem original.



Fonte: o próprio autor.

Os códigos computacionais têm por função entregar a análise da estrutura esqueletonizada, revelando os seguintes dados: número de trabéculas, número de ramos em cada trabécula, número de junções e número de pontos triplos de interconectividade, além da média do comprimento dos ramos e o valor do comprimento máximo do ramo, ou seja, o maior ramo avaliado. De forma resumida, o plugin “*AnalyzeSkeleton*” (disponível em: <https://imagej.net/plugins/analyze-skeleton/>) analisa imagens esqueletonizadas em 2D ou 3D. O algoritmo identifica cada pixel na imagem esqueletonizada e os classifica em pixels terminais (end-point), intermediários (slab) e pixels junccionais (junction), depois de classificados são todos contados. As variáveis fornecidas pela esqueletonização foram: Número de trabéculas (Tb [n]), número de ramos (R [n]), número de junções (J [n]), comprimento médio de ramo (CR [μ m]) e comprimento máximo de ramo (Max.CR [μ m])

Para blocos com mais material para ser analisado, mais imagens foram feitas para representar melhor o aspecto geral da lesão. Estas áreas de hot spot analisadas nesta técnica

foram escolhidas então baseadas na porção de osso lesional ou perilesional que tinham a presença bem definida de trabéculas para análise.

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism9 (Boston, EUA). Foi realizada análise descritiva, seguida pela avaliação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. O coeficiente de correlação de Spearman foi calculado para identificar correlação entre os parâmetros analisados nas trabéculas e os escores de expressão da esclerostina. A magnitude da correlação foi avaliada pelo valor de R, quando: maior ou igual 0,9, uma correlação muito forte; entre 0,89 e 0,7, forte; entre 0,69 e 0,4, moderada; menor ou igual a 0,39, fraca. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Em uma análise inicial, compreendendo os casos de 2016 até 2022, mais de 50 biópsias eram de lesões fibro-ósseas ou DF. Ao fim, com a seleção refinada de blocos que permitiriam a obtenção dos cortes histológicos, o total de casos foi de 10 pacientes, sendo o material recebido no Biobanco advindo de 4 serviços, sendo 3 casos de fora do município de Florianópolis, 1 caso de um serviço privado e os demais de serviços vinculados a UFSC. Apenas em um caso foi incluído o Fibroma Ossificante como diagnóstico diferencial na ficha de biópsia. A proporção de sexo dos pacientes que tiveram a biópsia analisada foi de 50% do sexo masculino e 50% do sexo feminino. O osso maxila foi a região mais afetada pela DF, sendo 5 casos presentes somente na maxila e apenas 3 em mandíbula e 2 casos em ambos os ossos gnáticos (Tabela 1). Ademais, os dados clínicos acessados mostraram uma média de idades dos pacientes de 22,5 anos, tendo a idade mínima de 8 anos e máxima de 32 anos de idade.

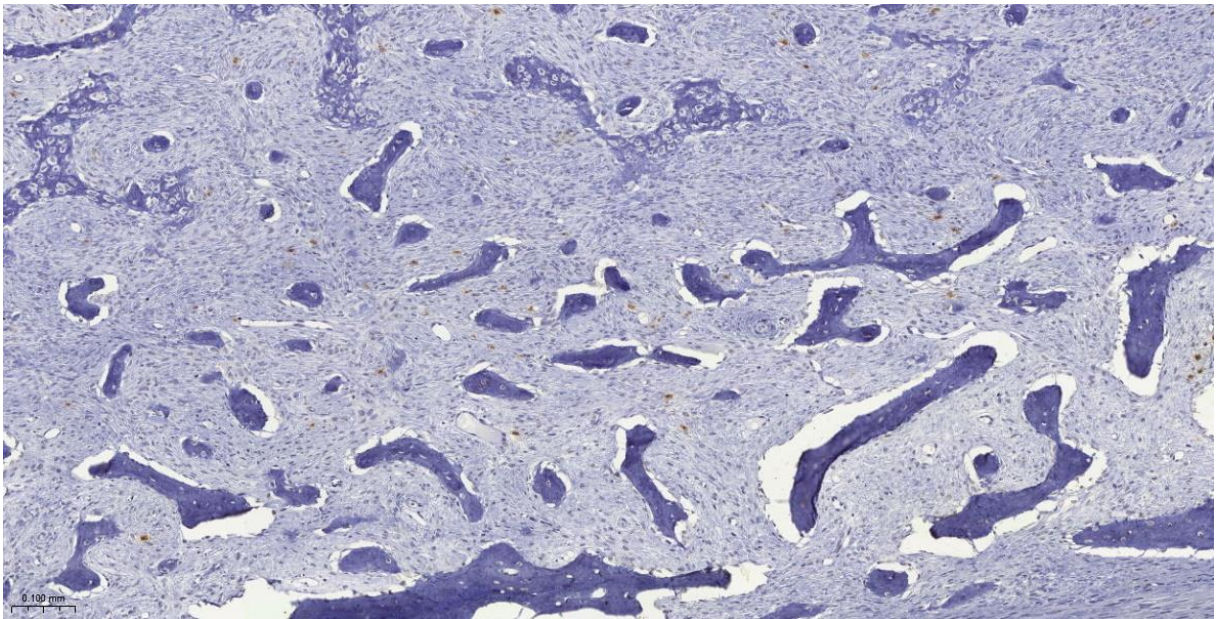
Tabela 1: Relação entre localização da lesão e sexo dos pacientes.

Localização	Masculino (n)	%	Feminino (n)	%	Total (%)
Mandíbula	1	10	2	20	3 (30)
Maxila	3	30	2	20	5 (50)
Mandíbula e Maxila	1	10	1	10	2 (20)
Total	5	50	5	50	10 (100)

(n = número).

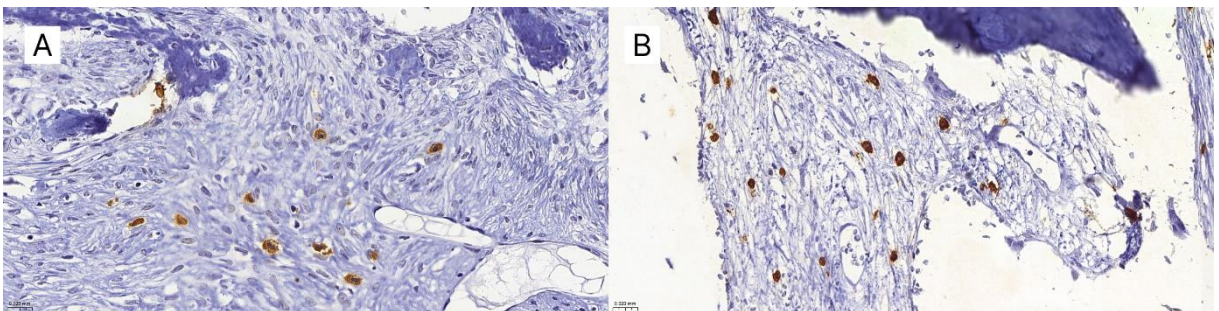
Pela variabilidade do material recebido, por vezes de biópsias incisionais, e por vezes por produto de ressecção ou plastia, foram avaliados 14 blocos dos 10 pacientes. Nas lesões de DF avaliadas, foi observado um padrão do componente ósseo com trabéculas ósseas irregulares, com presença de osteócitos em seus espaços lacunares distribuídos na matriz, sendo no tecido ósseo neoformado a presença de lacunas visualmente maiores, e no osso maduro as lacunas de osteócitos se mostraram menores (Figura 2). Ausência de rima de osteoblastos na superfície óssea mostra que isso não era um achado frequente, apenas em situações focais e específicas. Sobre o componente fibroso, por vezes apresentava-se de maneira frouxa (Figura 3B) e outras vezes com disposição densa (Figura 3A), sendo um tecido bastante celularizado em sua maior parte. Todas as lesões apresentaram grande quantidade de vasos sanguíneos no componente fibroso e foi possível notar áreas hemorrágicas em alguns casos.

Figura 2 – Evidente área de lesão.



Legenda: A) Fotomicrografia em 10x mostrando tecido conjuntivo fibroso denso ricamente celularizado, com trabéculas de tecido ósseo neoformado com disposição de lacunas de osteócitos em maior dimensão na parte superior e trabéculas ósseas de osso eminentemente lamelar apresentando lacunas menores na parte inferior da imagem. Também, é possível observar células imuno-marcadas para a proteína esclerostina em coloração acastanhada dispostas no tecido conjuntivo fibroso. Fonte: o próprio autor.

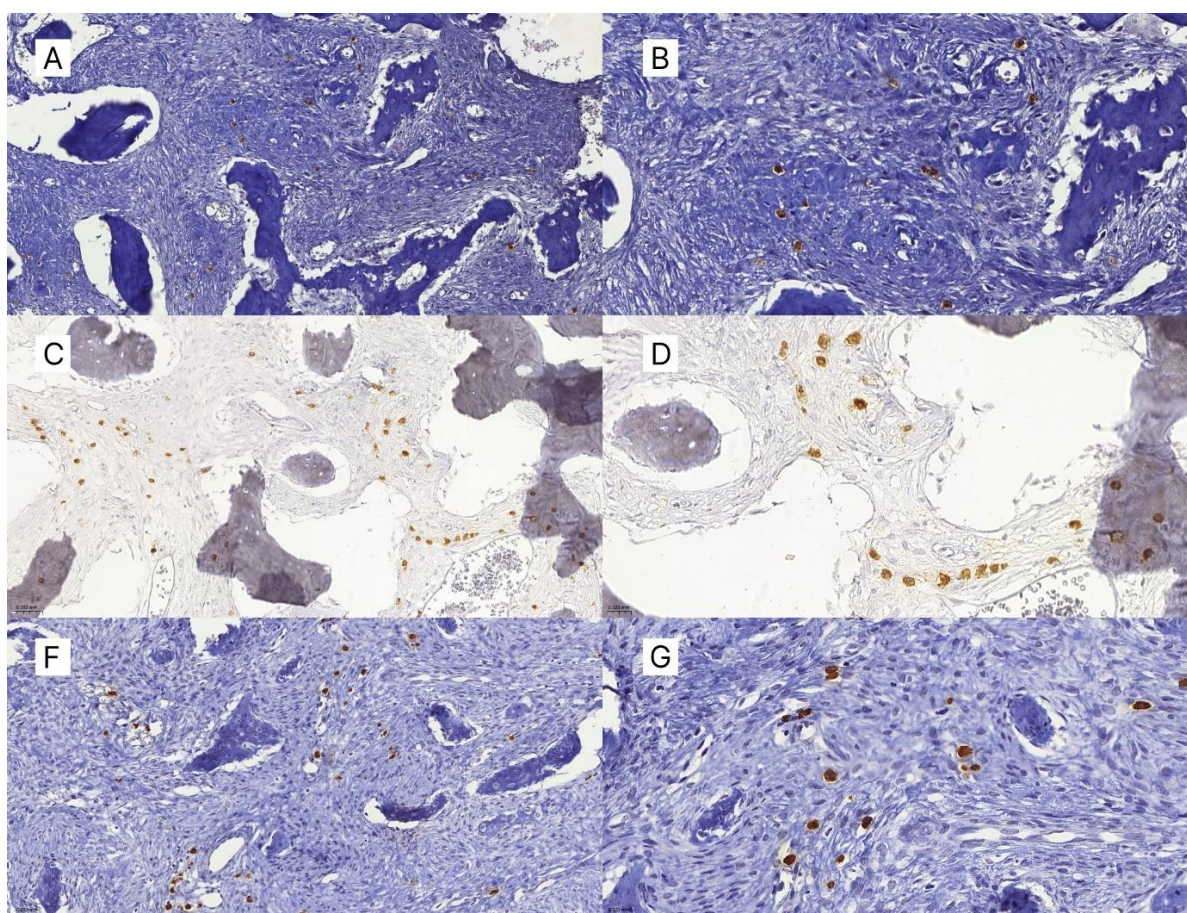
Figura 3 – Regiões específicas de duas lesões de DF mostrando diferentes arranjos do componente fibroso.



Legenda: Fotomicrografia em aumento de 400x de dois casos de displasia fibrosa. A) apresentando componente de tecido fibroso denso e ricamente celularizado, incluindo trabéculas ósseas irregulares. B) Tecido conjuntivo fibroso de arranjo frouxo, quando comparado com o tecido da imagem A. Pode-se perceber diminuição em quantidade celular em relação a outra lâmina, além da presença de evidentes espaços vasculares. Pode-se notar células positivas para esclerostina revelando um fenótipo semelhante aos mastócitos, com aparência que lembra um “ovo frito”, com padrão de marcação citoplasmática, dispostas no tecido conjuntivo fibroso. Fonte: o próprio autor.

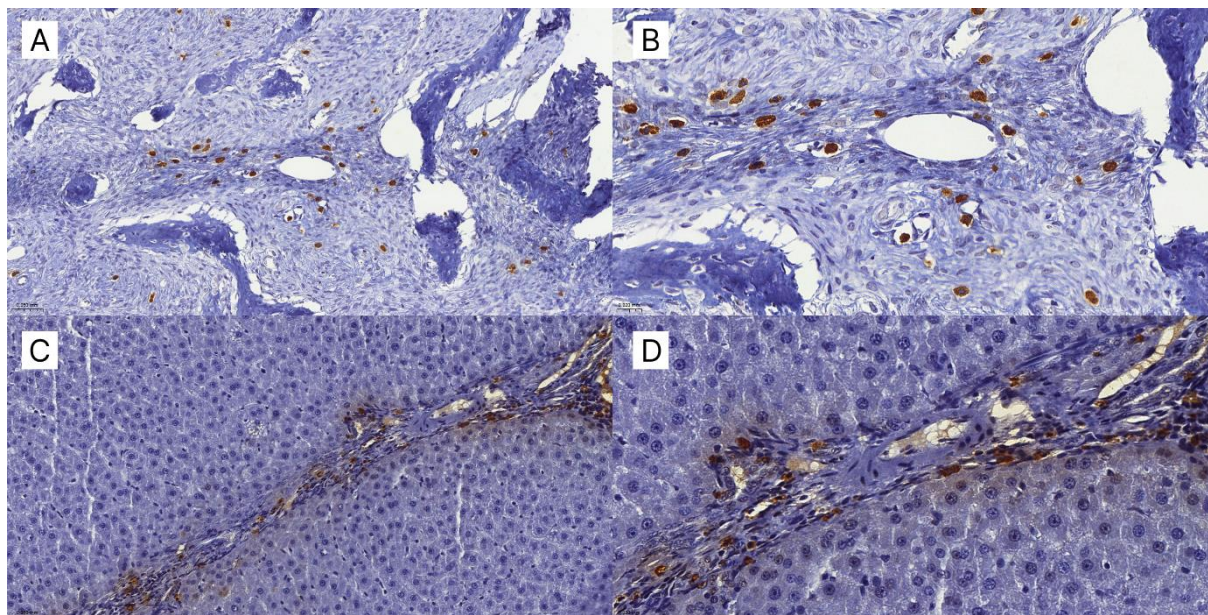
Um total de 12 lâminas de seis biópsias apresentaram marcação positiva para a proteína, que foram analisadas em completo, inclusive com o cálculo da área de tecido analisada para o cálculo do escore ponderado. A partir das lâminas, 10 apresentaram marcação em células do componente fibroso, 1 lâmina apresentou marcação no componente ósseo e 1 lâmina apresentou marcação em ambos os componentes. No tecido conjuntivo fibroso, as células que apresentaram imuno-marcação de coloração acastanhada para a proteína em questão apresentaram-se com fenótipos semelhantes aos mastócitos, sendo uma marcação citoplasmática e em formato granular ou em pontos (Figura 4 e Figura 5). Já a marcação óssea foi possível identificá-la dentro dos espaços lacunares do osteócito.

Figura 4 – Fotomicrografias de lesões de DF mostrando diferentes arranjos e organização das células marcadas para esclerostina.



Legenda: A, C e F) Fotomicrografias com aumento de 200x; B, D e G) Fotomicrografias com aumento de 400x de lâminas de displasia fibrosa. Trabéculas ósseas irregulares com osteócitos em seus espaços lacunares em meio a um tecido conjuntivo fibroso, ricamente vascularizado. Células marcadas com IHQ em padrão *dots* no citoplasma, apresentando núcleo de coloração arroxeada, dispostas em meio ao tecido fibroso, apresentando-se agrupadas ou solitárias

Figura 5 – Expressão imuno-histoquímica da esclerostina em lesões de DF e no controle positivo.



Legenda: A) Fotomicrografia em aumento de 200x mostrando trabéculas ósseas irregulares em meio à tecido conjuntivo fibroso denso celularizado e presença de vaso sanguíneo. Agrupados de células imuno-marcadas; B) Fotomicrografia em maior aumento (400x) onde nota-se células semelhantes a mastócitos, com padrão de marcação citoplasmático de coloração castanha e núcleo corado em azul; C e D) Fotomicrografia (200 e 400x, respectivamente) advinda de fígado humano usado para o controle positivo do anticorpo utilizado. A marcação positiva foi visualizada no espaço porta, sem marcação forte ou mais evidente nos hepatócitos. Fonte: o próprio autor.

Sobre a imunoexpressão da esclerostina, houve um total de 8 produtos analisados com escore 0 (57,1%), apenas um com escore 1 (7,1%) e 5 com escore 3 (35,8%). Nenhum produto enquadrou-se no escore 2 (0%) (Tabela 2). Os resultados apresentados no escore ponderado (Score_P) para lâminas de score 3 foi de 0, 53 até 1,77 (0,53; 0,71; 0,79; 1,32 e 1,77), já para o caso que obteve escore 1 o escore ponderado foi de 1,29, casos com escore 0 obtiveram um Score_P de 0.

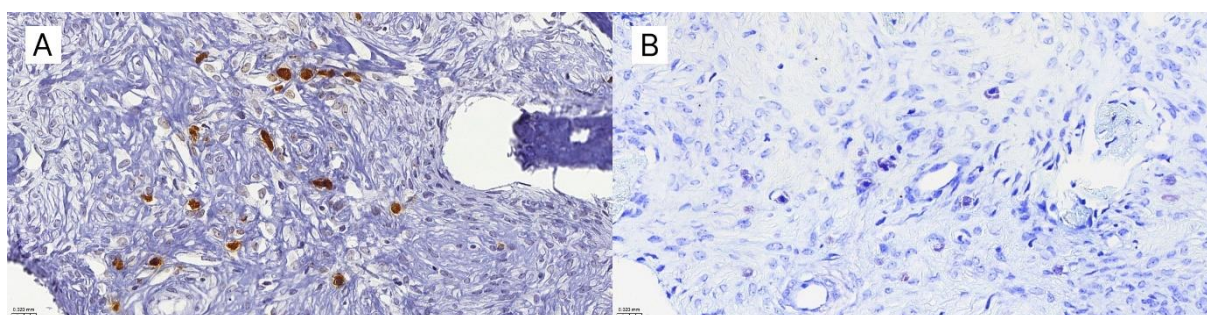
Tabela 2: Escore da marcação celular avaliada pela porcentagem da coloração imuno positiva em 14 biópsias avaliadas advindas dos 10 pacientes.

Lesão	Escore n (%)				Total
	0	1	2	3	
DF	8 (57,1)	1 (7,1)	0 (0)	5 (35,8)	14 (100)

(n = número, DF= displasia fibrosa).

A partir da similaridade das células marcadas pela esclerostina ser fenotipicamente semelhante aos mastócitos, a técnica histoquímica em azul de toluidina foi aplicada para confirmação do padrão de coloração e metacromasia (Figura 6). A metacromasia tem característica importante na detecção de mastócitos por possuir a peculiaridade de corar os grânulos presentes no citoplasma destas células em cores arroxeadas e avermelhadas devido a mudança na absorção do corante.

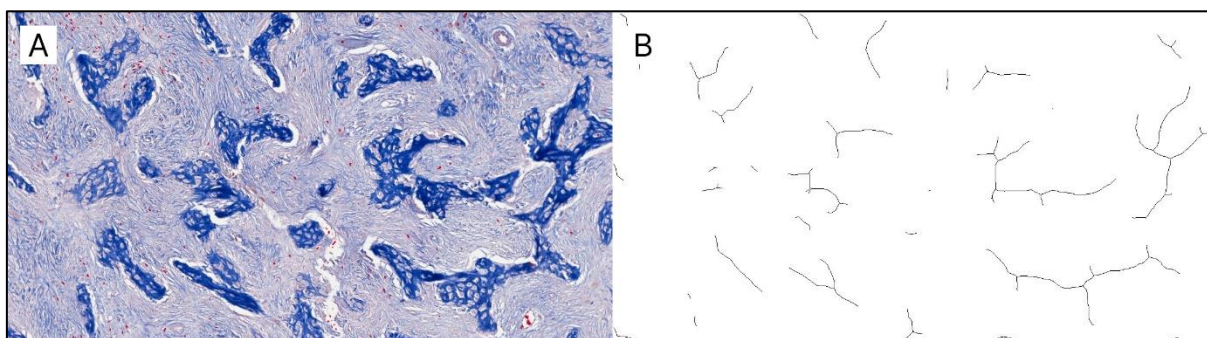
Figura 6 – Visualização das células marcadas e a mesma região corada em azul de toluidina



Legenda: A) Fotomicrografia em aumento de 400x, pode se notar células semelhantes a mastócitos, com marcação citoplasmática em *dots* de cor acastanhada e núcleo corado em roxo. B) Fotomicrografia em aumento de 400x, em técnica histoquímica com azul de toluidina mostrando células apresentando metacromasia Fonte: o próprio autor.

A análise histomorfométrica das trabéculas foi realizada para apenas 6 casos (Figura 7), isso porque para o uso do código computacional, deveria haver uma predominância de cor no componente ósseo, que só era visualmente identificável em 6 casos dos 10 pacientes selecionados. A média de trabéculas foi de $31,7 \pm 13,8$ e a média de ramos foi de $5,1 \pm 1,4$. A média de junções foi de $2,1 \pm 0,7$. O comprimento médio dos ramos foi de 34,19 micrômetros, com desvio-padrão de 17,45 μm . A média do comprimento máximo dos ramos avaliados foi de $63,43 \pm 36,47 \mu\text{m}$

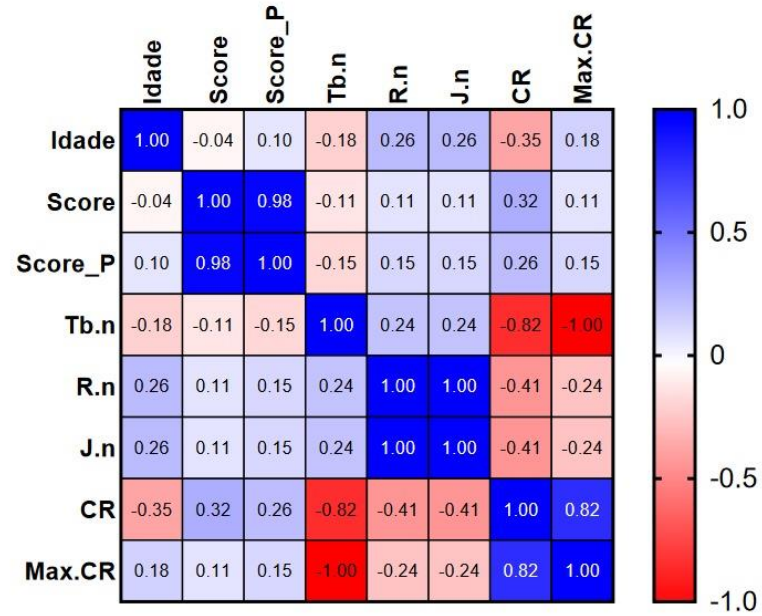
Figura 7 – Esqueletonização do tecido trabecular



Legenda: A) Fotomicrografia em Tricrômico de Mallory mostrando trabéculas ósseas imaturas dispostas irregularmente em um estroma de tecido conjuntivo fibroso bastante celularizado; B) Fotografia mostrando o esqueleto resultante do processo de esqueletonização semiautomático para análise dos parâmetros. Fonte: o próprio autor.

O teste de correlação de Spearman para as variáveis Idade (n), Score (n), Score_P (n), Tb (n), R (n), J (n), CR (μm) e Max.CR (μm) mostrou: correlação positiva muito forte para os valores de Score e Score_P ($p = 0,008$); negativa muito forte para as variáveis Max.CR e Tb ($p = 0,003$); correlação positiva fraca para J e Tb ($p = 0,003$); positiva forte para Max.CR e CR ($p = 0,05$) e negativa forte para CR e Tb ($p = 0,05$). Não houve correlação entre a expressão da esclerostina com os valores encontrados dos parâmetros trabeculares (Figura 8).

Figura 8 – Matriz de Correlação. Correlações positivas em azul e negativas em vermelho. A magnitude da correlação está demonstrada pela intensidade da cor e pelo valor de r inserido dentro do quadrado.



Fonte: o próprio autor.

6. DISCUSSÃO

Esta pesquisa avaliou o tecido lesional de pacientes diagnosticados com DF e a expressão da esclerostina, uma proteína com potente papel na sinalização dos eventos da regulação óssea. Os resultados mostraram a presença da esclerostina em células com citoplasma granular semelhante fenotipicamente aos mastócitos, sendo encontradas principalmente no componente fibroso. Apenas dois casos mostraram expressão da proteína nos osteócitos. Ainda, não houve correlação entre a expressão da esclerostina com parâmetros que avaliam a interconectividade trabecular.

A partir dos dados clínicos e patológicos, foi possível observar a média de idades dos pacientes que possuíam a doença, além da localização do sítio lesional. Obtivemos uma média de idade de 22,5 anos, além disso, não notamos predileção ao sexo. Estes achados estão em consonância aos dados previamente expostos por Nelson e Phillips (2019), os quais analisaram LFOBs e suas características clínicas, denotando a não predileção por sexo do paciente e o diagnóstico da DF sendo geralmente na primeira ou segunda década de vida.

Sobre a esclerostina, apesar de ela ser vista como uma proteína específica do osteócito, sendo detectada em osteócitos humanos por Winkler (2003) e outros autores, alguns estudos mostram a expressão em outras regiões e populações celulares, incluindo cartilagem, rins, coração, fígado e em certas patologias como cânceres com células de linhagem óssea (WEIVODA; YOUSSEF; OURSLER, 2017). Para além dos osteócitos, encontrar a imunexpressão da esclerostina no componente fibroso da Displasia Fibrosa traz à luz a hipótese de que estas células também estariam expressando essa proteína respeitando sua função primária, que é a inibição da formação óssea. Faz sentido pensar que inibindo formação óssea, a substituição do componente ósseo pelo tecido conjuntivo seja facilitada de alguma forma.

Ainda que a proteína possa ser encontrada em sítios diferentes, não há literatura contendo informações sobre a expressão de esclerostina em mastócitos, como sugere a marcação imuno-histoquímica e histoquímica (azul de toluidina) deste trabalho. Dessa forma, o ineditismo deste trabalho versa na identificação de esclerostina em células semelhantes aos mastócitos, e aponta para uma nova fase da pesquisa, com marcação IHQ destas mesmas células pela triptase, um indicador do fenótipo mastocítico. Ainda, foi importante observar que a proteína estava presente no componente fibroso destas lesões, mas também, em duas ocasiões (20% dos pacientes deste estudo), foi encontrada expressa pelos osteócitos.

Mesmo que a literatura atual não forneça informações sobre a proteína sendo expressa por mastócitos, sobre as LFOBs, apenas o estudo de Inagaki et al. (2016) avaliou a expressão da esclerostina, por meio da imuno-histoquímica, em lesões fibro-ósseas e neoplásicas diagnosticadas em ossos longos de pacientes em um serviço de ortopedia. A partir dos dados expostos por Inagaki e colaboradores, em sua pesquisa onde descreveu a presença de imunomarcação da proteína na região perilacunar dos osteócitos em 6 casos de DF analisados, vale reiterar que estas lesões eram de ossos longos como o fêmur, todavia, não houve marcação no componente fibroso. Por vez, vendo a existência da proteína esclerostina no componente fibroso da DF nos ossos maxilares encontrada neste trabalho, pode-se sugerir que alguns mecanismos podem influenciar nessa diferença com o estudo mencionado anteriormente. Para além da biomecânica e funções metabólicas, podemos ainda indagar também sobre uma diferença crucial entre esses ossos, como a influência do processo de ossificação, tendo em vista que o osso fêmur apresenta ossificação endocondral, enquanto a ossificação dos ossos gnáticos é intramembranosa. A progressão de uma lesão de displasia fibrosa nesses ossos então apresenta mecanismos diferentes, mas ambos com participação da esclerostina. Ainda, Zhu et al. (2017) buscaram a expressão de esclerostina, sérica e imuno-histoquímica, em metástases ósseas advinda do câncer de mama, onde observou um aumento do nível da proteína nos pacientes que apresentaram metástases ósseas quando comparado com os pacientes sem metástase, e notou-se também que a inibição da proteína diminuiu a migração e invasão das células do câncer de mama e, ainda, sugeriu que a inibição da esclerostina por anticorpo monoclonal pode prevenir lesões osteolíticas.

Sobre outro achado relevante do nosso estudo, foi a similaridade fenotípica das células que expressam a esclerostina com os mastócitos. Os mastócitos são células do sistema imune que residem em todos os tecidos vascularizados do corpo. Mastócitos são capazes de secretar diversos componentes presentes no interior dos seus grânulos citoplasmáticos, eles possuem e são conhecidos pela função em reações alérgicas agudas (MARICHAL; TSAI; GALLI, 2013). Além disso, Ragipoglu et al. (2020) aponta a importância dos mastócitos para diversas condições fisiológicas e patológicas, como: homeostase tecidual, regulação da angiogênese, além de estarem presentes em doenças cardiovasculares e gastrointestinais. Os mastócitos sintetizam, armazenam e são capazes de liberar mediadores que se mostraram úteis na regulação e homeostase óssea, entretanto já foram relatados em condições patológicas no tecido ósseo em pesquisas que observaram aumento do número de mastócitos em pacientes com massa óssea reduzida, como na osteoporose (RAGIPOGLU; DUDECK; HAFFNER-LUNTZER; VOSS; KRONER; IGNATIUS; FISCHER, 2020). Os resultados encontrados na

técnica IHQ mostram uma marcação citoplasmática positiva para a proteína esclerostina em células fenotipicamente semelhantes a mastócitos, que geralmente encontraram-se próximas de vasos sanguíneos. A interação dos mastócitos na regulação da angiogênese e a presença e função da esclerostina no tecido, pode sugerir um papel significativo desses fatores no desenvolvimento da DF, contribuindo por uma menor formação óssea.

No que diz respeito à avaliação histomorfométrica, não observamos correlação entre os achados trabeculares e a esclerostina, apesar disso, houve sim correlações significantes dentro dos diferentes achados deste método. Um ponto principal é que a não correlação pode ter sido influenciada pelo fato que a expressão da esclerostina não foi realmente óssea, e em dois dos casos, foi positiva em um osso predominantemente cortical, em contrapartida, a análise histomorfométrica pela esqueletonização foi realizada unicamente na porção trabecular do osso. Ainda, conforme Valenzuela e Pietschmann (2016) apontam em seu estudo, a análise da histomorfometria óssea pode contribuir no conhecimento da fisiopatologia da distribuição trabecular, visto que há possibilidade da avaliação da microarquitetura óssea. De forma interessante, não houve correlação dos achados histomorfométricos das trabéculas com a expressão da esclerostina, considerando o escore. Como a expressão da proteína foi predominantemente no componente fibroso, podemos pensar que a ausência de correlação com a interconectividade e o arranjo trabecular pode estar relacionada a este fato. Ainda pode-se pensar em uma hipótese de correlação da esclerostina com o componente fibroso, visto a principal função já relacionada a esta proteína, que é inibir a formação óssea, e se existe a substituição do tecido ósseo pelo tecido conjuntivo na DF, esse pode ser um dos mecanismos envolvidos nesta troca; no entanto, ainda precisamos progredir na avaliação dos casos especificamente positivos para a proteína e, posteriormente, fazer avaliações histomorfométricas mais aprofundadas, como também para avaliar de forma mais detalhada os dados do componente fibroso.

O trabalho possui algumas limitações. Visando uma maior compreensão da expressão da esclerostina na DF nos ossos gnáticos bem como a presença dos mastócitos e a sua função fisiológica e fisiopatológica para o osso nestas condições, futuros estudos com maior quantidade amostral de casos de displasia fibrosa fazem-se necessários. Além disso, a investigação de novos imuno-marcadores para identificações proteicas e celulares, como para identificação dos mastócitos.

7. CONCLUSÃO

Concluiu-se que:

- A proteína esclerostina foi encontrada no componente fibroso da displasia fibrosa em aproximadamente metade dos casos analisados, ainda, dois casos mostraram positividade também em osteócitos;
- Células imunomarcadas para esclerostina apresentam-se fenotipicamente semelhante a mastócitos, e em grande parte das lâminas apresentaram contato íntimo com espaços vasculares;
- Não houve correlação entre a expressão da esclerostina e a distribuição e interconectividade das trabéculas ósseas na displasia fibrosa.

8. REFERÊNCIAS

- MAINVILLE, G. N.; TURGEON, D. P.; KAUZMAN, A. Diagnosis and management of benign fibro-osseous lesions of the jaws: a current review for the dental clinician. **Oral Diseases**, v. 23, n. 4, p. 440–450, 1 maio 2017.
- NELSON, B. L.; PHILLIPS, B. J. Benign Fibro-Osseous Lesions of the Head and Neck. **Head and neck pathology**, v. 13, n. 3, p. 466–475, 1 set. 2019
- BRANNON, R. B.; FOWLER, C. B. Benign fibro-osseous lesions: a review of current concepts. **Advances in anatomic pathology**, v. 8, n. 3, p. 126–143, maio 2001
- NEVILLE, B. W. et al. **Patologia oral e maxilofacial**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016
- RICALDE, P.; MAGLIOCCA, K. R.; LEE, J. S. Craniofacial fibrous dysplasia. **Oral and maxillofacial surgery clinics of North America**, v. 24, n. 3, p. 427–441, ago. 2012.
- BARON, R.; RAWADI, G. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. **Endocrinology**, v. 148, n. 6, p. 2635-2643, jun. 2007. DOI: 10.1210/en.2007-0270. Epub 2007 Mar 29. PMID: 17395698.
- MADEIRA, M. et al. **Guia Prático em Osteometabolismo**. 1. ed. São Paulo: [s.n]
- PELLETIER, S. et al. [Sclerostin: a new biomarker of interest in nephrology]. **Annales de biologie clinique**, v. 73, n. 3, p. 305–313, 1 maio 2015
- VERED, M.; WRIGHT, JM. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumours. **Head Neck Pathol**, v. 16, n. 1, p. 63-75, mar. 2022. DOI: 10.1007/s12105-021-01404-7. Epub 2022 Mar 21. PMID: 35312978; PMCID: PMC9019005.
- MACDONALD-JANKOWSKI, D. S. Fibro-osseous lesions of the face and jaws. **Clinical Radiology**, v. 59, n. 1, p. 11–25, 2004
- EL-MOFTY, S. K. Fibro-Osseous Lesions of the Craniofacial Skeleton: An Update. **Head and Neck Pathology**, v. 8, n. 4, p. 432, 27 nov. 2014
- DICAPRIO, Matthew R. Fibrous Dysplasia. **The Journal Of Bone And Joint Surgery (American)**, [S.L.], v. 87, n. 8, p. 1848, 1 ago. 2005. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.2106/jbjs.d.02942>.
- EVERSOLE, Roy; SU, Lan; ELMOFTY, Samir. Benign Fibro-Osseous Lesions of the Craniofacial Complex A Review. **Head And Neck Pathology**, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 177-202, 13 maio 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12105-008-0057-2>.
- HAMEED, M.; HORVAI, AE.; JORDAN, RCK. Soft Tissue Special Issue: Gnathic Fibro- Osseous Lesions and Osteosarcoma. **Head Neck Pathol**, v. 14, n. 1, p. 70-82, mar. 2020. DOI: 10.1007/s12105-019-01094-2.

ABRAMOVITCH, K.; RICE, D. D. Benign Fibro-Osseous Lesions of the Jaws. **Dental Clinics of North America**, v. 60, n. 1, p. 167–193, 1 jan. 2016

BURKE, Ab; COLLINS, Mt; AMBOYCE. Fibrous dysplasia of bone: craniofacial and dental implications. **Oral Diseases**, [S.L.], v. 23, n. 6, p. 697-708, set. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/odi.12563>

CHAPPARD, D.; BASLÉ, M.-F.; LEGRAND, E.; AUDRAN, M. Trabecular bone microarchitecture: a review. **Morphologie**, [S.L.], v. 92, n. 299, p. 162-170, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.morpho.2008.10.003>.

CHAVASSIEUX, P.; CHAPURLAT, R. Interest of Bone Histomorphometry in Bone Pathophysiology Investigation: Foundation, Present, and Future. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 13, p. 907914, 28 jul. 2022. DOI: 10.3389/fendo.2022.907914. PMID: 35966102; PMCID: PMC9368205.

HOF, Rob J. van 'T; ROSE, Lorraine; BASSONGA, Euphemie; DAROSZEWSKA, Anna. Open source software for semi-automated histomorphometry of bone resorption and formation parameters. **Bone**, [S.L.], v. 99, p. 69-79, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2017.03.051>.

SILVA, Layza Maria; VENÂNCIO, Jessyca Figueira; LOURES, Adriano de Oliveira; LOPES, Daniella Guedes de Figueiredo; DECHICHI, Paula; RABELO, Gustavo Davi. Efeito do Diabetes Mellitus tipo I na organização espacial das trabéculas ósseas: análise por meio do processo de esqueletonização. **Hu Revista**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 07-13, 8 fev. 2019. Universidade Federal de Juiz de Fora. <http://dx.doi.org/10.34019/1982-8047.2018.v44.13926>.

Doube M, Kłosowski MM, Arganda-Carreras I, Cordelières FP, Dougherty RP, Jackson JS, Schmid B, Hutchinson JR, Shefelbine SJ. BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. **Bone**, 2010 Dec;47(6):1076-9. doi: 10.1016/j.bone.2010.08.023.

WEIVODA, Megan M.; YOUSSEF, Stephanie J.; OURSLER, Merry Jo. Sclerostin expression and functions beyond the osteocyte. **Bone**, [S.L.], v. 96, p. 45-50, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2016.11.024>.

RABELO, Gustavo Davi; COUTINHO-CAMILLO, Claudia; KOWALSKI, Luiz Paulo; PORTERO-MUZY, Nathalie; ROUX, Jean-Paul; CHAVASSIEUX, Pascale; ALVES, Fabio Abreu. Evaluation of cortical mandibular bone in patients with oral squamous cell carcinoma. **Clinical Oral Investigations**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 783-790, 24 jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-017-2153-8>.

MARINI, Francesca; GIUSTI, Francesca; PALMINI, Gaia; BRANDI, Maria Luisa. Role of Wnt signaling and sclerostin in bone and as therapeutic targets in skeletal disorders. **Osteoporosis International**, [S.L.], v. 34, n. 2, p. 213-238, 18 ago. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-022-06523-7>.

OMRAN, Ahmed; ATANASOVA, Diana; LANDGREN, Filip; MAGNUSSON, Per. Sclerostin: from molecule to clinical biomarker. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 9, p. 4751, 26 abr. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23094751>.

KRISHNAN, V. Regulation of bone mass by Wnt signaling. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 116, n. 5, p. 1202-1209, 1 maio 2006. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci28551>.

APPEL, H. et al. Altered skeletal expression of sclerostin and its link to radiographic progression in ankylosing spondylitis. **Arthritis and rheumatism**, v. 60, n. 11, p. 3257–3262, nov. 2009

ROUDIÉ, M. et al. Sclerostin is expressed in articular cartilage but loss or inhibition does not affect cartilage remodeling during aging or following mechanical injury. **Arthritis and rheumatism**, v. 65, n. 3, p. 721–731, mar. 2013

LIM, S. Y.; BOLSTER, M. B. Profile of romosozumab and its potential in the management of osteoporosis. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 1221–1231, 13 abr. 2017

RIBATTI, D. The Staining of Mast Cells: A Historical Overview. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 176, n. 1, p. 55-60, 2018. DOI: 10.1159/000487538.

WINKLER, D. G.. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. **The Embo Journal**, [S.L.], v. 22, n. 23, p. 6267-6276, 1 dez. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdg599>.

INAGAKI, Yusuke; HOOKWAY, Edward s; KASHIMA, Takeshi G; MUNEMOTO, Mitsuru; TANAKA, Yasuhito; HASSAN, Andrew Bassim; OPPERMAN, Udo; ATHANASOU, Nick. Sclerostin expression in bone tumours and tumour-like lesions. **Histopathology**, [S.L.], v. 69, n. 3, p. 470-478, 8 abr. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/his.12953>.

ZHU, Menghai; LIU, Changzhen; LI, Shifei; ZHANG, Shudong; YAO, Qi; SONG, Qingkun. Sclerostin induced tumor growth, bone metastasis and osteolysis in breast cancer. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 470-478, 12 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-11913-7>.

MARICHAL, Thomas; TSAI, Mindy; GALLI, Stephen J.. Mast Cells: potential positive and negative roles in tumor biology. *Cancer Immunology Research*, [S.L.], v. 1, n. 5, p. 269-279, 1 nov. 2013. **American Association for Cancer Research (AACR)**. <http://dx.doi.org/10.1158/2326-6066.cir-13-0119>.

RAGIPOGLU, Deniz; DUDECK, Anne; HAFFNER-LUNTZER, Melanie; VOSS, Martin; KRONER, Jochen; IGNATIUS, Anita; FISCHER, Verena. The Role of Mast Cells in Bone Metabolism and Bone Disorders. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, p. 1-13, 7 fev. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.00163>.

VALENZUELA, Elena Nebot; PIETSCHMANN, Peter. Epidemiology and pathology of Paget's disease of bone – a review. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, [S.L.], v. 167, n. 1-2, p. 2-8, 6 set. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10354-016-0496-4>.

ANEXO 1 – ATA DA DEFESA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ODONTOLOGIA

ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos 30 dias do mês de outubro de 2023, às 11:00 horas, em sessão pública no (a) sala H202 desta Universidade, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professor Dr. Gustavo Davi Rabelo

e pelos examinadores:

1 - Elena Riet Correa Rivero

2 - Ricardo Luiz Cavalcanti De Albuquerque Junior

o aluno Thiago Pires Claudio

apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação intitulado: Expressão da esclerostina na displasia fibrosa: correlação clínico-patológicos como requisito curricular indispensável à aprovação na Disciplina de Defesa do TCC e a integralização do Curso de Graduação em Odontologia. A Banca Examinadora, após reunião em sessão reservada, deliberou e decidiu pela aprovação do referido Trabalho de Conclusão do Curso, divulgando o resultado formalmente ao aluno e aos demais presentes, e eu, na qualidade de presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo aluno orientando.



Documento assinado digitalmente
Gustavo Davi Rabelo
Data: 08/11/2023 15:12:46-0300
CPF: ***.748.750-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Presidente da Banca Examinadora



Documento assinado digitalmente
Elena Riet Correa Rivero
Data: 08/11/2023 13:56:30-0300
CPF: ***.083.500-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Examinador 1



Documento assinado digitalmente
Ricardo Luiz Cavalcanti De Albuquerque Junior
Data: 08/11/2023 18:22:21-0300
CPF: ***.876.344-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Examinador 2



Documento assinado digitalmente
Thiago Pires Claudio
Data: 07/11/2023 22:00:56-0300
CPF: ***.032.430-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Aluno

ANEXO 2 – TRECHOS DO PARECER DO CEP SH/UFSC

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Processamento de imagens na avaliação de lesões ósseas orais**Pesquisador:** Gustavo Davi Rabelo**Área Temática:****Versão:** 3**CAAE:** 28234620.0.0000.0121**Instituição Proponente:** Departamento de Odontologia**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.063.334

Continuação do Parecer: 4.063.334

Investigador	Projeto_detalhado.pdf	24/03/2020 00:28:03	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Projeto_001.pdf	23/01/2020 09:53:16	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Dec_CCS.pdf	17/12/2019 14:25:12	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_Final.pdf	17/12/2019 14:23:25	Gustavo Davi Rabelo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 02 de Junho de 2020

 Assinado por:
 Maria Luíza Bazzo
 (Coordenador(a))