

Avaliação da agressividade da lesão de células gigantes periférica da cavidade bucal através de estudo histoquímico-imunohistoquímico

Evaluation of the aggressiveness of peripheral giant cell lesion of the oral cavity by means of a hystochemical-immunohistochemical study

Resumo

Objetivo: Estudar a agressividade da lesão de células gigantes periférica (LCGP) através de um estudo histoquímico e imunohistoquímico.

Metodologia: Foram revisados os arquivos da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP) e da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo (FOUPF), tendo sido obtidos 181 casos de LCGP, dos quais 61 preencheram os critérios de elegibilidade. Primeiramente, graduou-se a agressividade das LCGPs, que foram distribuídas em três grupos de estudo com base em achados clínicos e radiográficos. Em seguida, os cortes histológicos das 61 LCGPs, corados por H.E., foram analisados para confirmação diagnóstica. Posteriormente, investigou-se a proliferação celular de 15 casos de LCGPs através de contagem e aferição da área de AgNORs (regiões de organização nucleolar) e avaliação da imunoposição dos marcadores PCNA, Ki-67 e p53.

Resultados: Não se constatou diferença na área das AgNORs e na expressão do PCNA entre as LCGPs dos três grupos estudados, e o p53 não foi efetivo na imunomarcagem das lesões analisadas. Notou-se diferença estatisticamente significativa no número de AgNORs e na expressão do Ki-67 entre os grupos estudados.

Conclusão: Os resultados de AgNOR e Ki-67 sugerem que a agressividade clínico-radiográfica das LCGPs pode ser relacionada com sua atividade proliferativa celular.

Palavras-chave: Lesão periférica de células gigantes; diagnóstico; impregnação pela prata; imunohistoquímica

João Paulo De Carli^a
Norberto Perri Moraes^b
Marcelo Macedo Crivelini^c
Soliete Oliveira da Silva^d
Maria Salete Sandini Linden^e
Micheline Sandini Trentin^e

^a Disciplinas de Diagnóstico Oral, Prótese Total e Clínica Integrada, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil

^b Disciplina de Estomatologia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp, Araçatuba, SP, Brasil

^c Disciplina de Patologia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp, Araçatuba, SP, Brasil

^d Disciplinas de Patologia e Diagnóstico Oral, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil

^e Disciplina de Periodontia e Implantodontia, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil

Abstract

Purpose: To study the aggressiveness of peripheral giant cell lesion (PGCL) using hystochemical-immunohistochemical analysis.

Methods: The archives of the Dental School of Araçatuba (FOA-UNESP) and the University of Passo Fundo Dental School (FOUPF) were searched. A total of 181 PGCL cases were retrieved, and 61 met the study eligibility criteria. Firstly, the PGCL aggressiveness was graded, and the lesions were distributed into three groups based on clinical and radiographic findings. The 61 LCGPs hystopathological samples were colored by H.E. and analyzed for diagnostic confirmation. Afterwards, the cellular proliferation of 15 PGCLs cases was investigated by means of counting and calibrating of AgNORs (nucleolar organizer regions) area and evaluation of the immunoposition of PCNA, Ki-67, and p53 markers.

Results: No difference was found for AgNOR area and PCNA expression among PGCLs of the three studied groups, and p53 was not an effective immunomarker of the analyzed lesions. There was a statistically significant difference of AgNORs number and Ki-67 expression among the three groups.

Conclusion: The AgNOR and Ki-67 results suggest that the PGCL clinical-radiographic aggressiveness can be related to its cellular proliferative activity.

Key words: Giant cell peripheric lesion; diagnosis; silver staining; immunohistochemistry

Correspondência:
João Paulo De Carli
Rua Bento Gonçalves, 967/204, Centro
Passo Fundo, RS – Brasil
99010-010
E-mail: joaoestomatologia@yahoo.com.br

Recebido: 27 de fevereiro, 2008
Aceito: 13 de maio, 2008

Introdução

A lesão de células gigantes periférica da cavidade bucal (LCGP) é definida como uma enfermidade benigna, proliferativa e reacional do tecido conjuntivo fibroso ou do perioste, que acomete considerável parcela da população em geral, quando comparada às outras lesões proliferativas não-neoplásicas da mucosa bucal (1-3).

As NORs (regiões de organização nucleolar) são segmentos de DNA agregados nos nucléolos que codificam RNA ribossômico e são responsáveis pelo desenvolvimento do nucléolo, estando envolvidas na síntese de ribossomos e de proteínas (4). As AgNORs representam regiões de várias NORs agrupadas, não discerníveis individualmente em microscopia de luz. No caso da proliferação celular aumentada, observam-se aumento do número de AgNORs por núcleo celular e diminuição de sua área (4).

O PCNA (*proliferating cell nuclear antigen* – antígeno de proliferação nuclear celular) é uma proteína auxiliar da DNA polimerase-delta, que se mostra aumentada tardiamente nas fases G₁ e S do ciclo celular, diminuindo na fase G₂, e alcançando níveis baixos na fase M e em células inativas (G₀) (5). O PCNA tem sido utilizado na tentativa de avaliar o perfil de proliferação celular de lesões de células gigantes, mostrando resultados conflitantes (6,7).

O Ki-67 (*Kiel-67*) é um antígeno nuclear expresso em todas as fases ativas do ciclo celular, mormente expressado durante as fases G₁, S, G₂ e M do ciclo celular, mas ausente em células quiescentes (G₀) (8).

O gene supressor de tumor p53 codifica uma proteína que está envolvida na síntese e no reparo do DNA, na morte celular programada e na regulação negativa do ciclo celular; desempenha um importante papel na regulação normal da divisão celular (9) e sua inativação tem sido descrita em muitos tumores, resultando num produto que pode, por vezes, ser demonstrado imunohistoquimicamente.

Apesar de a LCGP ser considerada pela maioria dos autores como uma lesão pouco agressiva, existem estudos que reportam casos com potencial clínico-radiográfico agressivo (10-15). Entretanto, não há relatos de experimentos que relacionam a atividade proliferativa celular com diferentes graus de agressividade clínico-radiográfica em LCGPs, utilizando-se técnicas histoquímicas e ou imunohistoquímicas.

Assim, é propósito deste trabalho, por meio de um estudo retrospectivo laboratorial, pesquisar a agressividade da LCGP por meio de aspectos histoquímicos e imunohistoquímicos.

Metodologia

O projeto de pesquisa foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP) e da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo (FOUPF).

Seleção dos casos e coleta dos dados

De um total de 181 casos de LCGP registrados na FOA-UNESP e na FOUPF, foram elegíveis para o presente es-

tudo 61. Foram utilizados apenas os casos com comprovação histológica de LCGP, casos com blocos de parafina com espessura suficiente para microtomia e confecção de novas lâminas microscópicas, e casos com requisições de exames histopatológicos com dados clínicos e radiográficos disponíveis. Para a certificação de que as lesões eram mesmo periféricas, foram analisados os dados clínicos, bem como o aspecto das radiografias, que não apresentavam reabsorção óssea ou mostravam erosão óssea em “forma de taça”, característica marcante das LCGPs (16).

Gradação da agressividade clínico-radiográfica das LCGPs

Fez-se a gradação da agressividade dos 61 casos selecionados utilizando-se critérios adaptados de Chuong et al. (17) e Whitaker et al. (18) para dosar a agressividade clínico-radiográfica das lesões de células gigantes centrais (LCGCs). Valorizaram-se como achados mais importantes na determinação da agressividade das lesões:

Achados clínicos: presença de sintoma dor na lesão; tempo de evolução da lesão menor que dois meses; dimensão da lesão maior que 2cm no seu maior diâmetro; ocorrência de pelo menos um episódio de recidiva.

Achados radiográficos: presença de reabsorção óssea subjacente à lesão; reabsorção radicular dos dentes próximos à lesão; afastamento dos dentes próximos à lesão. A cada achado clínico ou radiográfico presente na LCGP examinada somou-se 1 ponto ao grau de agressividade dessa lesão, sendo que lesões com grau 7 foram consideradas extremamente agressivas, lesões com grau mínimo 0 (zero) foram consideradas não-agressivas, lesões com graus 1 e 2 foram consideradas de agressividade leve, lesões com graus 3 e 4 possuíam agressividade moderada e lesões com graus 5 e 6, agressividade severa.

Para o estudo histoquímico e imunohistoquímico foram utilizados apenas 15 casos de LCGP, devido ao alto custo destas técnicas laboratoriais. Estes casos foram divididos em 3 grupos: 5 LCGPs com grau de agressividade clínico-radiográfica zero (0)/nula; 5 com grau de agressividade clínico-radiográfica três (3)/moderada e 5 com graus de agressividade clínico-radiográfica cinco (5) e seis (6)/severa.

Estudo histoquímico com AgNORs

Para os 15 casos de LCGPs, a AgNOR seguiu a técnica descrita por Ploton et al. (19) e otimizada por Nunes et al. (20), realizada em cortes de 6µm feitos em blocos de parafina contendo material de biópsia das lesões.

As análises da quantidade de AgNORs e da área das mesmas foram realizadas com objetiva de imersão (1000X), com auxílio do programa computacional Leica QWin®, em microscópio Leica DMLB® (Wetzlar, Alemanha) e câmera fotográfica digital JVC-TK-C® (São Paulo, SP, Brasil). Obteve-se uma contagem e aferiu-se a área individual das AgNORs de cem núcleos celulares por espécime (50 núcleos de células gigantes multinucleadas e 50 núcleos de células ovóides). Para a contagem, utilizava-se da ferramenta “contar” do sistema computacional anteriormente referido, sendo que a cada clique com o *mouse*, o compu-

tador registrava uma AgNOR no campo microscópico com os núcleos previamente contados. Após a contagem dos núcleos e das AgNORs, o mesmo campo era utilizado para medir a área de cada AgNOR, o que era feito circundando-se cada estrutura com o *mouse*. As células nas quais os procedimentos anteriormente descritos foram realizados se localizavam na região central das LCGPs e foram aleatoriamente escolhidas. A média do número de AgNORs por núcleo celular de células gigantes e de células ovóides (N), bem como a área média das AgNORs (em μm^2) dos núcleos de células gigantes e de células ovóides (A), foram calculadas para as 5 LCGPs de cada um dos três grupos estudados, utilizando as seguintes equações:

$$N = \frac{\Sigma(\text{N}^\circ \text{ de AgNORs})}{\text{N}^\circ \text{ de núcleos}} \quad A = \frac{\Sigma(\text{área das AgNORs})}{\text{N}^\circ \text{ de AgNORs}}$$

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por ANOVA e teste de Tukey (21), ao nível de significância de 5%.

Estudo Imunohistoquímico com PCNA, p53 e Ki-67

Para os 15 casos de LCGPs selecionados realizou-se a imunohistoquímica pela técnica da streptavidina-biotina amplificada por imunoperoxidase (6-7), em cortes de $3\mu\text{m}$ feitos em blocos de parafina contendo material de biópsia das

lesões. A análise da quantidade de células marcadas pelo PCNA, p53 e Ki-67 foi realizada com objetiva de imersão (1000X) e com auxílio do programa computacional Leica QWin®, em microscópio Leica DMLB® e câmera fotográfica digital JVC-TK-C®. Obteve-se uma contagem dos núcleos de células ovóides mononucleadas positivos imunorreativos e não-imunorreativos de 5 campos pertencentes a cada lesão, aleatoriamente escolhidos na região central de cada espécime tecidual. Os dados referentes a cada um dos marcadores (PCNA, p53 e Ki-67), para os três grupos analisados, foram analisados estatisticamente por ANOVA e teste de Tukey (21), ao nível de significância de 5%.

Resultados

Estudo Histoquímico – AgNOR

Em todos os cortes examinados as AgNORs foram evidenciadas como pontos acastanhados escuros dentro do núcleo celular, exibindo principalmente forma ovalada e variações de número e diâmetro (Fig. 1). O número médio de AgNORs por núcleo celular mostrou diferença significativa entre os três grupos de agressividade clínico-radiográfica, tanto para as células ovóides quanto para as células gigantes; por outro lado, a área média das AgNORs não foi diferente entre os três grupos estudados (Tabela 1).

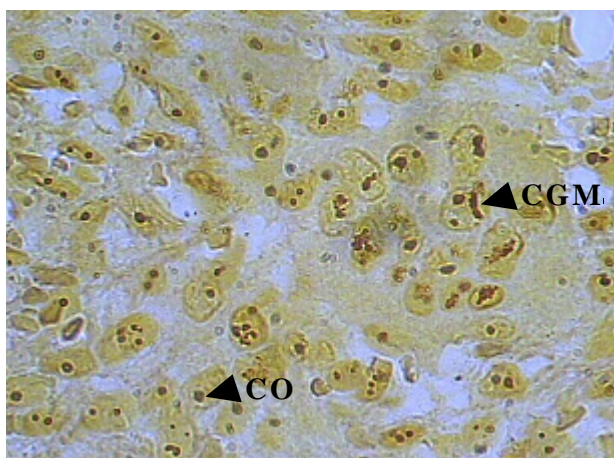


Fig. 1. Fotomicrografia evidenciando aspecto padrão de marcação das NORs pela prata: AgNORs de núcleos de células ovóides (esquerda – CO), e de uma célula gigante multinucleada (direita – CGM) (AgNOR, 1000X).

Tabela 1. Comparação entre as médias* (desvio-padrão: DP) do número de AgNORs por núcleo celular e área das AgNORs, separadamente nas células ovóides e nas células gigantes multinucleadas dos casos analisados.

	Número de AgNORs por núcleo				Área das AgNORs (μm^2)			
	Células ovóides		Células gigantes		Células ovóides		Células gigantes	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Grau 0 (n=5)	1,36 ^a	0,12	1,26 ^a	0,05	12,29 ^a	1,81	24,84 ^a	4,84
Grau 3 (n=5)	1,64 ^b	0,14	1,44 ^{ab}	0,06	12,68 ^a	2,18	29,16 ^a	3,78
Graus 5/6 (n=5)	2,06 ^c	0,21	1,60 ^b	0,21	11,63 ^a	1,80	26,45 ^a	6,15
P valor (ANOVA)	0,0001		0,0052		0,6979		0,4160	

* Letras diferentes acompanhando os valores das médias indicam a existência de diferença estatisticamente significativa.

Estudo Imunohistoquímico (PCNA, p53 e Ki-67)

Houve uma uniformidade de expressão do PCNA nas células ovóides. Estas, quando positivas, mostravam núcleo de coloração acastanhada de intensidade variável. As células gigantes multinucleadas (CGM) não se mostraram imunorreativas ao PCNA (Fig. 2). Comparando-se a imunopressividade do PCNA nas células ovóides dos três grupos analisados, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os mesmos (Tabela 2).

Para o Ki-67, notou-se uma imunopressividade menor do que no PCNA. No entanto, houve também uma uniformidade de expressão nas células ovóides da lesão. Estas, quando positivas, mostravam núcleo de coloração acastanhada de intensidade variável. As CGM não se mostraram reativas ao Ki-67, a exemplo do que ocorreu com o PCNA. Comparando-se a imunopressividade do Ki-67 nas células ovóides dos três grupos analisados, observou-se diferença estatisticamente significativa do grupo III (graus 5 e 6) em relação ao grupo I (grau 0) e grupo II (grau 3) (Tabela 2). Os 15 casos avaliados mostraram células ovóides e CGM não-imunorreativas ao p53.

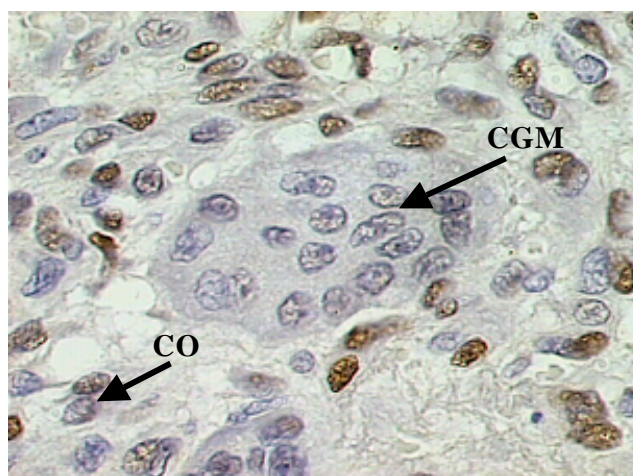


Fig. 2. Técnica da imunohistoquímica. Fotomicrografia evidenciando que a célula gigante multinucleada (CGM) e algumas células ovóides (CO) não são imunorreativas ao PCNA. Núcleos em castanho representam positividade na marcação (PCNA, 1000X).

Tabela 2. Comparação entre as médias* (desvio-padrão: DP) de células ovóides imunorreativas ao PCNA e de células ovóides imunorreativas ao Ki-67 dos três grupos com diferentes agressividades clínico-radiográficas.

Grupo de agressividade clínico-radiográfica	Porcentagem (%) de células PCNA+		Porcentagem (%) de células Ki-67+	
	Média	DP	Média	DP
Grau 0 (n=5)	49,45 ^a	6,51	4,95 ^a	2,08
Grau 3 (n=5)	50,75 ^a	3,99	5,66 ^a	1,72
Graus 5/6 (n=5)	57,44 ^a	4,40	10,30 ^b	2,46

Discussão

Para melhor compreender os relatos da literatura relativos à agressividade clínico-radiográfica das LCGPs (12,14,15), o presente trabalho investigou a proliferação celular dessa lesão através de estudo histoquímico e imunohistoquímico.

Através da metodologia utilizada, foram encontradas diferenças significativas no número médio de AgNORs por núcleo celular entre os três grupos estudados, tanto nas células ovóides quanto nas CGM, obtendo-se um número médio de AgNORs por núcleo celular diretamente proporcional ao grau de agressividade clínico-radiográfica das LCGPs. Dessa forma, com base nas afirmações de Ruschoff et al. (4), os achados do presente estudo sugerem a existência de associação entre o grau de agressividade clínico-radiográfica e a proliferação celular tecidual. Whitaker et al. (22) também verificaram um número de AgNORs maior em LCGCs com agressividade clínico-radiográfica mais alta. Por outro lado, estes resultados diferem daqueles de Souza et al. (6) que, ao compararem casos de LCGP com casos de LCGC, não encontraram diferença significativa no número médio de AgNORs por núcleo celular.

Para a área média das AgNORs, não houve diferença significativa ao se comparar os três grupos estudados, tanto

para as AgNORs de células ovóides quanto para as de CGM; isto indica que a área das AgNORs não seria relevante no estudo da atividade proliferativa celular das LCGPs com diferentes graus de agressividade clínico-radiográfica. Assim, os achados deste trabalho diferem das afirmações de Ruschoff et al. (4), os quais afirmam que quanto maior o número de AgNORs, menor é a área média das mesmas.

Os resultados da presente investigação mostram que o padrão de expressão do PCNA foi consistente, marcando uniformemente células ovóides das LCGPs, corroborando achados anteriores (6,7). Quanto à média da porcentagem de células ovóides PCNA positivas no total de LCGPs analisadas, obteve-se 52,5%, à semelhança do estudo de Souza et al. (6), que obtiveram 50,5%.

Por outro lado, as CGM não mostraram expressão do PCNA. Este fato também foi observado por Souza et al. (6), segundo os quais isto indicaria que as células gigantes multinucleadas não fazem parte do compartimento proliferativo das LCGPs, sugerindo que estas células têm sua origem associada a uma linhagem osteoclástica, formada a partir de células mononucleares diferenciadas. Portanto, os resultados com PCNA no presente estudo sugerem a origem periosteal para as LCGPs.

Comparando os três grupos de agressividade clínico-radiográfica de LCGPs analisadas no presente estudo quanto à imunopositividade do PCNA nas células ovóides, observou-se que quanto maior o grau de agressividade clínico-radiográfica das lesões, maior a tendência das células serem imunorreativas ao PCNA, o que poderia indicar que as LCGPs mais agressivas clínico-radiograficamente apresentariam maior atividade proliferativa celular. No entanto, a diferença obtida entre os três grupos estudados não foi estatisticamente significativa. Os resultados obtidos são diferentes dos relatados por Souza et al. (7), os quais encontraram maior número de células mononucleadas positivas ao PCNA no grupo composto por LCGCs do que naquele composto por tumores de células gigantes dos ossos longos (TCGs – lesões neoplásicas, por vezes malignas, diferentes das lesões de células gigantes dos maxilares). Por outro lado, os resultados do presente estudo corroboram os achados de Souza et al. (6), que não encontraram diferença significativa de imunopositividade do PCNA entre LCGPs e LCGCs. É importante salientar que não foram encontrados na literatura estudos com o PCNA que avaliassem as LCGPs em função de diferentes graus de agressividade clínico-radiográfica. Assim, novos estudos a respeito do assunto devem ser realizados.

Os resultados da presente pesquisa mostram que o padrão de expressão do Ki-67 foi consistente, marcando uniformemente células ovóides das LCGPs, sendo que foram encontradas 6,97% de células ovóides positivas ao Ki-67, em média. Estes resultados são concordes aos reportados por Souza et al. (6), que afirmam ter encontrado 4,31% das células ovóides positivas ao Ki-67 nas LCGPs. Quanto às CGM, estas não mostraram imunopositividade ao Ki-67, corroborando estudos anteriores (6-7), que afirmam que estas células não fazem parte do compartimento proliferativo das lesões de células gigantes (LCGC, LCGP e TCG); formam-se a partir da união de células mononucleadas diferenciadas e pertencem, provavelmente, a uma linhagem celular osteoclástica, indicando, tal como o PCNA, que a etiopatogenia das LCGPs está relacionada ao periosteio.

Em relação ao estudo da imunopositividade do Ki-67 nas LCGPs analisadas, observou-se uma relação positiva entre o maior grau de agressividade clínico-radiográfica das lesões e maior número de células ovóides imunorreativas ao Ki-67. Estatisticamente, foram as LCGPs de agressividade severa (graus 5 e 6) que mostraram número maior de células ovóides imunorreativas ao Ki-67. Isso indica uma tendência de as LCGPs mais agressivas clínico-radiograficamente apresentarem maior atividade proliferativa celular. Souza et al. (6) também encontraram maior imunorreatividade das células ovóides de LCGPs ao Ki-67,

quando comparada com a de LCGCs. Por outro lado, Kruse-Lösler et al. (23) não encontraram diferenças entre LCGCs clínico-radiograficamente agressivas e não-agressivas, e Kauzman et al. (24) afirmaram não existir diferença entre a imunomarcação do Ki-67 em LCGCs e TCGs.

Utilizou-se o p53 neste trabalho porque esse marcador biológico também tem sido usado em lesões não-neoplásicas e em associação com inflamação (25). Todos os casos de LCGPs avaliados mostraram células ovóides e CGM não-imunorreativas ao p53, independentemente do grau de agressividade clínico-radiográfica das lesões. Considerando-se que a LCGP tem natureza benigna e que alterações do p53 ocorrem caracteristicamente em lesões malignas, os resultados deste trabalho não são surpreendentes e coincidem com os reportados por outros autores que utilizaram o p53 para avaliar lesões de células gigantes (6,7,23). Segundo Souza et al. (7), a não-imunorreatividade do p53 em lesões de células gigantes provavelmente ocorre porque o produto proteico do gene MDM2 (*murine double minute*) liga-se com a proteína p53 formando um complexo que pode extinguir a função inibidora do crescimento que a p53 possui. Sendo assim, quando houver forte expressão do MDM2, fatalmente não se notará expressão do p53. Exemplo disto é que, além de não observarem imunopositividade do p53, Souza et al. (6,7) obtiveram uma forte expressão da MDM2 em estudos com lesões de células gigantes. Sendo assim, sugere-se que o p53 não é um marcador de proliferação celular efetivo para LCGPs.

Conclusão

Apesar da área média das AgNORs e da imunopositividade do PCNA não terem sido estatisticamente diferentes nos três grupos estudados, comprovou-se que o número médio de AgNORs por núcleo celular e a imunopositividade do Ki-67 são maiores quanto maior for o grau de agressividade clínico-radiográfica das LCGPs. Sendo assim, ao analisar o conjunto de resultados desta pesquisa, parece válido sugerir que a agressividade clínico-radiográfica das LCGPs está relacionada com fatores intrínsecos, mais especificamente com o potencial proliferativo celular da lesão. Esta constatação poderia nortear o adequado tratamento, menos ou mais conservador, desta doença.

Agradecimento

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo Auxílio à Pesquisa (Processo nº 05/53753-0), que possibilitou a realização do presente estudo.

Referências

1. Cloutier M, Charles M, Carmichael R, Sándor GK. An analysis of peripheral giant cell granuloma associated with dental implant treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:618-22.
2. 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 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:39-43.
3. Silverman Jr S, Eversole LR, Truelove EL. *Fundamentos de Medicina Oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
4. Ruschoff J, Plate K, Bittinger A, Thomas C. Nucleolar organizer regions (NORs): basic concepts and practical application in tumor pathology. *Pathol Res Pract* 1989; 185:878-85.
5. Hall PA, Coates PJ, Goodlad RA, Hart IR, Lane DP. Proliferating cell nuclear antigen expression in non-cycling cells may be induced by growth factors *in vivo*. *Br J Cancer* 1994;70:244-7.
6. Souza PE, Mesquita RA, Gomez RS. Evaluation of p53, PCNA, Ki-67, MDM2 and AgNOR in oral peripheral and central giant cell lesions. *Oral Dis* 2000; 6:35-9.
7. Souza PE, Paim JF, Carvalhais JN, Gomez RS. Immunohistochemical expression of p53, MDM2, Ki-67 and PCNA in central giant cell granuloma and giant cell tumor. *J Oral Pathol Med* 1999;28:54-8.
8. Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods* 2002;115:97-105.
9. Lane DP. Cancer p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358:15-6.
10. Grand E, Burgener E, Samson J, Lombardi T. Post-traumatic development of a peripheral giant cell granuloma in a child. *Dent Traumatol* 2008;24:124-6.
11. Ruiz BD, García FA, Cuéllar CN, Bucci T, Gil MC, Vila CN. Reparative giant cell granuloma in a pediatric patient. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12:331-5.
12. De Carli JP, Silva SO, Paza A. Lesão de células gigantes periférica: revisão de literatura e relato de um caso recidivante. *Rev APCD Reg Araçatuba* 2006;27:19-24.
13. De Carli JP, Moraes NP, Crivelini MM, Sundefeld ML, Silva SO. Avaliação da agressividade da lesão de células gigantes periférica da cavidade bucal por meio do estudo clínico-radiográfico de 61 casos. In: Linden MS. *Abordagens multidisciplinares em Odontologia*. Passo Fundo: UPF Editora; 2007. p. 161-83.
14. Cavezzi Jr O. Granuloma periférico de células gigantes. *RGO* 1997;45:149-52.
15. Pandolfi PJ, Feleffi S, Flaitz CM, Johnson JV. An aggressive peripheral giant cell granuloma in a child. *J Clin Pediatr Dent* 1999;23:353-5.
16. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquet JE. *Patologia Oral & Maxilofacial*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
17. Chuong R, Kaban LB, Kozakewich H, Perez-Atayde A. Central giant cell lesions of the jaws: a clinicopathologic study. *J Oral Maxillofac Surg* 1986; 44:708-13.
18. Whitaker SB, Waldron CA. Central giant cell lesions of the jaws: a clinical, radiologic and histopathologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;75:199-208.
19. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 1986;18:5-14.
20. Nunes FD, Pinto Jr DS, Araújo NS, Araújo VC. Estudo morfológico e otimização da técnica AgNOR. In: *Reuniao da Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas*; 1991, São Paulo (SP). *Anais da SBPqO*; 1991.
21. Callegari-Jacques SM. *Bioestatística: princípios e aplicações*. Porto Alegre: Artmed; 2004.
22. Whitaker SB, Vigneswaran N, Budnick SD, Waldron CA. Giant cell lesions of the jaws: evaluation of nucleolar organizer regions in lesions of varying behavior. *J Oral Pathol Med* 1993;22: 402-5.
23. Kruse-Lösler B, Diallo R, Gaertner C, Mischke KL, Joos U, Kleinheinz J. Central giant cell granuloma of the jaws: a clinical, radiologic and histopathologic study of 26 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:346-54.
24. Kautzman A, Li SQ, Bradley G, Bell RS, Wunder JS, Kandel R. Central giant cell granuloma of the jaws: assessment of cell cycle proteins. *J Oral Pathol Med* 2004;33:170-6.
25. Soini Y, Kamel D, Paakko P, Lehto VP, Oikarinen A, Vahakangas K. Aberrant accumulation of p53 associates with Ki-67 and mitotic counts in benign skin lesions. *Br J Dermatol* 1994;131:514-20.