

Expressão das proteínas ciclina B1, Rb1, P27, BMP4 e LCA no granuloma piogênico, no fibroma ossificante periférico e no granuloma piogênico com calcificações¹

Expression of the proteins cyclin B1, Rb1, P27, BMP4 and LCA in pyogenic granuloma, peripheral ossifying fibroma and pyogenic granuloma with calcification¹

Soliete Oliveira da Silva*
Liliane Soares Yurgel**

Resumo

Foi realizada neste estudo uma análise da expressão das proteínas ciclina B1, Rb1 (gene do retinoblastoma 1), P27 (proteína 27), BMP4 (proteína morfogenética do osso) e LCA (antígeno leucocitário comum), pelo método imunoistoquímico da dupla marcação, em 24 casos de lesões proliferativas gengivais, divididas em três grupos de acordo com suas características histopatológicas: Grupo I (granuloma piogênico), Grupo II (fibroma ossificante periférico) e Grupo III (granuloma piogênico com calcificações). O LCA foi empregado como primeiro anticorpo primário em todos os espécimes. Os genes ciclina B1, P27 e Rb1 têm um papel crítico na regulação da transição das fases do ciclo celular e frequentemente estão alterados em várias entidades neoplásicas. Portanto, foi objetivo do presente trabalho a comparação da expressão de tais proteínas entre as três lesões para obter informações sobre a atividade proliferativa das células presentes no tecido. O anticorpo anti-BMP4 foi empregado com o objetivo de avaliar e comparar sua expressão no estroma das lesões que produ-

zem material mineralizado. Os resultados demonstraram semelhança quanto à expressão das proteínas ciclina B1, Rb1, P27 e LCA nas lesões do Grupo I e do Grupo III e expressão distinta em relação às lesões do Grupo II. A expressão da proteína BMP4 nas lesões dos Grupos II e III sugere origens diferentes para o material mineralizado de tais lesões. A ausência de expressão da proteína BMP4 nas lesões do Grupo I confirma a ausência de células osteoprogenitoras em seu estroma.

Palavras-chave: granuloma piogênico, fibroma ossificante periférico, ciclina B1, Rb1, P27, BMP4, LCA.

Introdução

Proliferações teciduais, frequentemente encontradas na gengiva, são lesões que apresentam um componente inflamatório em cujo processo de maturação ocorre o aumento de fibras colágenas e a presença de material mineralizado, tanto sob a forma de “calcificações distróficas” como de “osso metaplásico”.

Afirma-se tanto que essas lesões sejam entidades patológicas distintas, como os seus quadros histológicos representem momentos evolutivos de uma única lesão (COOKE, 1952; KFIR et al., 1980). Questiona-se, quando se anali-

¹ Resumo de tese apresentada à Faculdade de Odontologia da PUCRS, como parte dos requisitos do título de Doutor em Estomatologia Clínica.

* Doutora em Estomatologia Clínica pela PUCRS.

** Doutora em Estomatologia Clínica pela PUCRS – Coordenadora do Programa de Pós-Graduação – Doutorado em Estomatologia da PUCRS.

Recebido: 27.06.2003 Aceito: 28.07.2003

sam o granuloma piogênico (GP) e o fibroma ossificante periférico (FOP), se a lesão fibrosa e o material mineralizado são decorrentes de um processo de maturação de um GP ou se a inflamação é secundária ao FOP.

Em virtude da semelhança clínica e histopatológica, acredita-se que alguns FOP se desenvolvem inicialmente de GP que sofreram maturação fibrosa e subsequente calcificação (NEVILLE et al., 2004), todavia o comportamento das duas lesões é distinto, particularmente a elevada tendência de recidiva do FOP. Isso se explica pela origem do granuloma piogênico em tecidos superficiais e do FOP em tecidos mais profundos, possivelmente no ligamento periodontal (KENDRICK e WAGGONER, 1996).

A análise da proliferação celular em várias patologias, por meio da técnica imunoistoquímica e da utilização de anticorpos monoclonais, tem demonstrado a sua relevância para a distinção entre células mais e menos proliferativas, bem como na avaliação do prognóstico e da histogênese de várias entidades patológicas. Neste trabalho, foram analisados os granulomas piogênicos e os fibromas ossificantes periféricos, separando-se as lesões que continham trabéculas ósseas das que apresentavam material mineralizado, sob a forma de calcificações distróficas ou glóbulos calcificados, num estroma fibroblástico altamente celular.

Para tanto, utiliza-se o LCA, que permite a observação em relação ao infiltrado linfoplasmocitário, com padrão de marcação no citoplasma e nas membranas celulares dos leucócitos (JANEWAY et al., 2002). Esse parâmetro pode ser considerado uma expressão morfológica de uma reação inflamatória, em muitos casos em virtude da presença de ulceração (a marcação com LCA foi empregada para excluir esta situação).

Para identificar células em proliferação na fase G2, especialmente os angioblastos, foi utilizada a ciclina B1 (LEE, 2000); a proteína BMP4 tem a função de identificar a proteína morfogenética do osso, tanto na matriz óssea como nas células osteoprogeni-

toras (MASUHARA et al., 1995), ambas com padrão de marcação citoplasmático.

Na identificação de células que se encontram na fase G1 – angioblastos, fibroblastos e osteoblastos – foi utilizada a proteína Rb1 (TANGUAY, et al., 1999). Em seu estado ativo, a pRb bloqueia a cascata de eventos que levam à proliferação celular. A P27, também conhecida como cdk inibidora da proteína 1 (Kip1), identifica as células que se encontram na transição da fase G1 para a S, angioblastos, fibroblastos e osteoblastos (KORKOLOPOULOU et al., 2000), ambas com padrão de marcação nuclear. Utiliza-se a proteína p27 na avaliação das células não proliferativas tanto de neoplasias como de tecidos normais.

Neste estudo realizou-se uma análise da expressão das proteínas, ciclina B1, Rb1, P27, BMP4 e LCA, pelo método imunoistoquímico da dupla marcação, em 24 casos de lesões proliferativas gengivais, divididas em três grupos de acordo com suas características histopatológicas.

Materiais e método

Foram utilizadas peças de biópsias armazenadas em blocos de parafina, totalizando oito amostras de granuloma piogênico (Grupo I), oito de fibroma ossificante periférico (Grupo II) e oito de granuloma piogênico com calcificações (Grupo III), nas quais se analisou a atividade proliferativa do tecido conjuntivo por meio de técnica imunoistoquímica, utilizando os marcadores para LCA, ciclina B1, Rb1, P27 e BMP4. A amostra foi constituída de casos registrados até dezembro de 2000 (Laboratório de Histopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da UPF e do Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS) com os diagnósticos histopatológicos de granuloma piogênico, fibroma ossificante periférico, fibroma ossificante periférico ulcerado, fibroma ulcerado contendo calcificações, granuloma fibroblástico calcificante ou granuloma piogênico calcificado.

Em cada bloco de parafina foram realizados cortes histológicos (5 mm de espessura) e uma lâmina de cada bloco foi corada pelo método da hematoxilina-eosina (HE), com a finalidade de padronizar as lâminas e confirmar o diagnóstico histopatológico.

Para realizar a técnica de imunoistoquímica foram feitos cortes com 3 mm de espessura, utilizando o sistema de dupla marcação DAKO EnVision® K 1395, para avaliação dos elementos celulares. Esse procedimento de imunomarcação detecta, ao mesmo tempo, dois antígenos no mesmo espécime.

O anticorpo para identificar o antígeno LCA foi o primeiro anticorpo primário utilizado em todas as lâminas e a revelação da reação foi feita com o cromógeno diaminobenzidina (DAB). O segundo anticorpo primário, utilizado para identificar os antígenos ciclina B1, Rb1, P27 e BMP4, foi identificado pelo cromógeno *fast red*.

Conforme orientações do fabricante, foram utilizados como controle positivo: cortes de linfonodo com metástase de carcinoma de mama, para o LCA e Rb1, cortes de tonsila, para a ciclina B1 e p27, e cortes de adenocarcinoma de próstata, para o BMP4. Os controles positivos foram incubados juntamente com os grupos experimentais.

Para o preparo das soluções foi realizado, primeiramente, o preparo da solução-tampão de lavagem (0,05M Tris-HCl pH 7,6, 0,15M NaCl - DAKO TBS). Posteriormente, realizou-se o preparo da solução substrato-cromógeno, líquido DAB+. Em sequência, os cortes histológicos foram posicionados em lâminas silanizadas (DAKO), levados à estufa, desparafinizados e reidratados. Posteriormente, efetuou-se a recuperação dos sítios antigênicos, exceto para o LCA e BMP4 (segundo orientação do fabricante).

Para o sistema de dupla marcação DAKO EnVision®, efetuaram-se o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 0,03%, a lavagem das lâminas com tampão Tris-HCl e a incubação dos anticorpos primários. A seguir, foi realizada a aplicação do Labelled Polymer HRP (*horseradish peroxi-*

dase) e repetiu-se a lavagem com a solução-tampão. Posteriormente, foi realizada a aplicação do cromógeno diaminobenzidina (DAB) e efetuado o bloqueio da dupla marcação. Aplicou-se o segundo anticorpo primário, o polímero AP (fosfatase alcalina), e a solução substrato-cromógeno (*fast red*). A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Mayer. Após, os cortes foram imersos num banho de amônia e as lamínulas, fixadas em glicergel. Os cortes, corados segundo a técnica imunoistoquímica, foram examinados em microscópio óptico binocular Zeiss-Standard 20. A marcação positiva apareceu como grânulos castanhos para o DAB (marcação para o LCA) e vermelha para o *fast red* (demais anticorpos). Foram analisadas somente as células marcadas no tecido conjuntivo das lesões. As lesões foram observadas atribuindo-se os valores 1 para presença e 0 para ausência de imunomarcação.

Após a avaliação das lâminas, os dados foram analisados por meio de estatística descritiva e pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (Siegel, 1975), aos níveis de significância de 1 e 5%, utilizando-se o programa Statistica for Windows, Versão 5.1 (Statsoft, Inc. USA, 1996).

Resultados

Foi observada a presença ou ausência de marcação para os anticorpos em todos os espécimes, bem como realizada comparação da expressão entre os três grupos de lesões estudadas, conforme pode ser observado na Tabela 1 e nas fotomicrografias (Fig. 1 a 5).

Tabela 1 - Expressão das proteínas ciclina B1, Rb1, P27, BMP4 e LCA nos três grupos de lesões avaliadas.

Grupos	Expressão das proteínas									
	CB1	Rb1	P27	BMP4	LCA					
	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
Grupo I (n=8)	5	3	2	6	2	6	0	8	8	0
Grupo II (n=8)	1	7	6	2	3	5	8	0	1	7
Grupo III (n=8)	4	4	3	5	3	5	3	5	7	1
Total (n=24)	10	14	11	13	8	16	11	13	16	8

Nas amostras do Grupo I, a imunomarcação para LCA distribuiu-se de forma generalizada nos leucócitos do tecido, corando-os em castanho em todas as lâminas. A ciclina B1 marcou em vermelho, especialmente os angioblastos, em cinco casos (Fig. 1). As proteínas Rb1 e P27 marcaram dois espécimes, revelando especialmente os fibroblastos da lesão. A proteína BMP4 não teve expressão em nenhum espécime do Grupo I (Fig. 2).

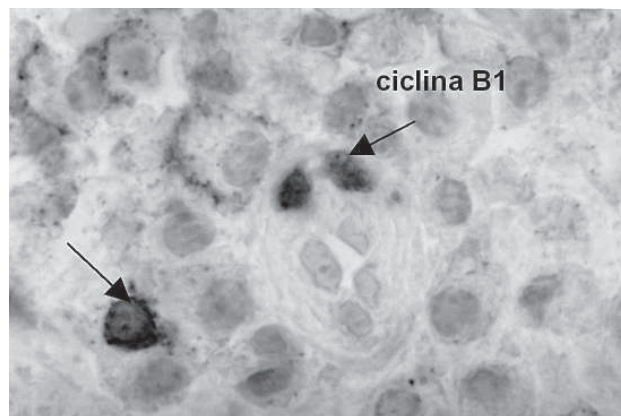


Figura 1 - Expressão da proteína LCA e Ciclina B1 no Grupo I (400x)

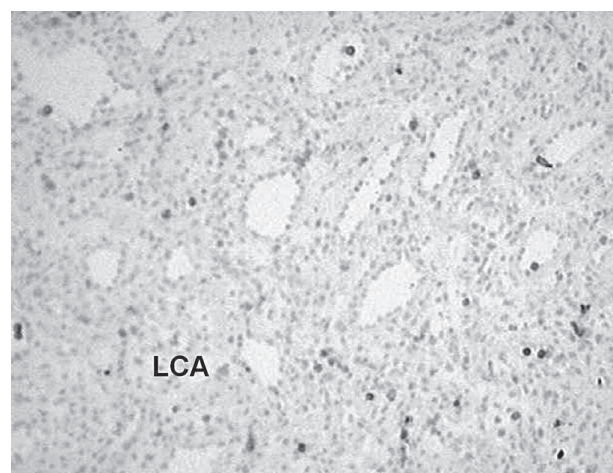


Figura 2 - Expressão da proteína LCA e BMP4 no Grupo I (200x)

A análise da presença ou ausência de marcação das proteínas, pela técnica imunoistoquímica, nas amostras examinadas do Grupo I revelou haver maior frequência das proteínas LCA e ciclina B1 em relação a Rb1 e P27, ($p = 0,011$) e em relação a BMP4 ($p = 0,007$), pelo teste de Mann-Whitney.

Em sete casos das amostras do Grupo II verificou-se ausência de expressão da proteína ciclina B1 (Fig. 3). A proteína Rb1 apresentou expressão em seis casos e a P27, em dois, marcando os fibroblastos e alguns angioblastos. A proteína BMP4 teve expressão nas células osteoprogenitoras e na matriz óssea em todos os casos (Fig. 4). O LCA teve expressão nos leucócitos em apenas um dos casos.

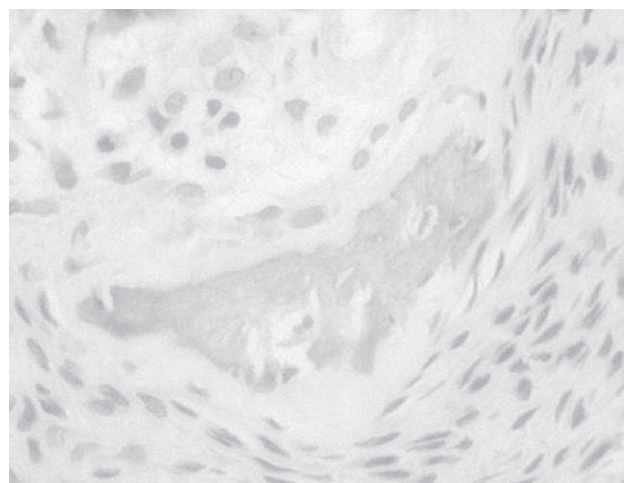


Figura 3 - Ausência de expressão da proteína LCA e ciclina B1 no Grupo II (200x)

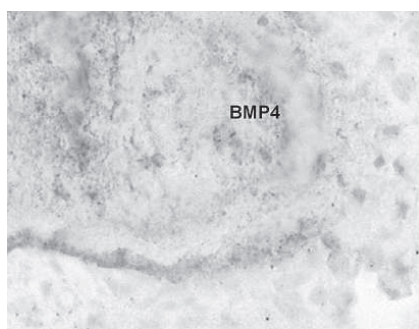


Figura 4 - Expressão das proteínas LCA e BMP4 no Grupo II (400x)

A análise da presença ou ausência de marcação imunoistoquímica no Grupo II revelou haver maior frequência das proteínas BMP4 e Rb1 em relação à ciclina B1 e LCA ($p = 0,035$). Também se observou maior frequência da proteína BMP4 em relação a P27 ($p = 0,035$). Já a proteína P27 não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação às demais ($p = 0,207$).

Os espécimes analisados no Grupo III evidenciaram positividade para o LCA em sete casos (leucócitos). Para a proteína ciclina B1, evidenciaram positividade nos angioblastos em quatro casos; as proteínas Rb1 (Fig. 5) e P27, em três casos cada uma nas células do tecido conjuntivo. A proteína BMP4 teve expressão em três casos entre as fibras do tecido conjuntivo.

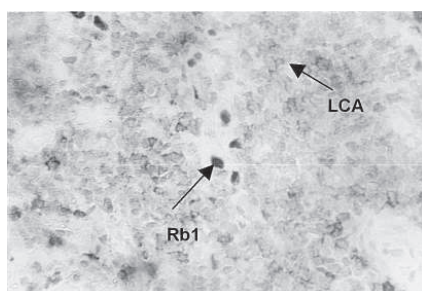


Figura 5 - Expressão das proteínas LCA e Rb1 no Grupo III (400x)

Com relação às amostras selecionadas do Grupo III, observou-se marcação com todas as proteínas utilizadas, entretanto a análise estatística demonstrou não haver diferença significativa da frequência entre as proteínas analisadas ($p = 0,092$).

A análise comparativa da presença ou da ausência de marcação imunoistoquímica entre as lesões do Grupo I e do Grupo II

revelou haver maior frequência da proteína LCA no Grupo I ($p = 0,0032$) e da ciclina B1 em relação às demais proteínas, e menor expressão, estatisticamente significativa, da proteína BMP4 no Grupo I ($p = 0,0007$). Em relação aos demais anticorpos, não houve diferença significativa ($p = 0,092$).

A análise estatística permitiu determinar uma frequência significativamente maior para a proteína BMP4 ($p = 0,035$) no Grupo II e maior frequência para a proteína LCA no Grupo III ($p = 0,011$), por meio da técnica imunoistoquímica. Os demais marcadores não mostraram diferença significativa para ambas as lesões ($p = 0,207$).

A análise comparativa da presença ou da ausência de marcação das proteínas entre o Grupo I e o Grupo III demonstrou não haver diferença significativa de expressão com os marcadores empregados ($p = 0,674$).

Discussão e conclusão

Quando foram observadas as lesões dos Grupos I e III pela análise da expressão da proteína LCA, constatou-se que sua distribuição ocorreu de modo semelhante entre os dois grupos. Já, na análise das lesões do Grupo II encontrou-se expressão desta proteína em um caso dos oito examinados, não havendo, portanto, relevância estatística. O emprego do LCA como primeiro anticorpo primário foi fundamental para bloquear uma possível ligação dos demais anticorpos (marcadores de ciclo celular) aos leucócitos, nos quais não se pretendia analisar a atividade proliferativa.

A ciclina B1 teve expressão tanto no Grupo I como no Grupo III, especialmente nos angioblastos; nessas duas lesões verificou-se um perfil de imunomarcação bastante semelhante, evidenciada em cinco casos do Grupo I e em quatro do Grupo III; no Grupo II esteve presente num caso, não havendo significância estatística. A expressão dessa proteína identifica células na fase G2 do ciclo celular, agindo como reguladora da transição da fase G2 para M. Conforme Pines e Hunter (1994) e Trembley et al.

(1996), a ciclina B1 é um marcador positivo da proliferação celular, isto é, indica que a atividade mitótica do tecido encontra-se acima dos níveis usuais. Neste estudo, não houve superexpressão da ciclina B1, situação observada nas células de neoplasias malignas.

A proteína Rb1, evidenciada no núcleo dos fibroblastos em seis casos nas lesões do Grupo II, apresentou diferença quanto à frequência de expressão em relação aos demais grupos. No Grupo I esteve presente em dois casos e em três do Grupo III; portanto, não foram constatadas diferenças significativas quanto à frequência de expressão nas lesões nos Grupos I e III. A Rb1 identifica as células na fase G1 do ciclo celular, quando, então, é pouco fosforilada. Portanto, a análise da expressão desta proteína nas lesões estudadas sugere que a proliferação celular é maior nas lesões dos Grupos I e III e que a atividade é menor nas lesões do Grupo II. A Rb hipofosforilada reprime a transcrição de genes que são normalmente expressos durante a fase S do ciclo celular, resultando em inibição do crescimento.

No presente trabalho, não foram observadas diferenças quanto à frequência de expressão da P27 entre as lesões dos Grupos I, II e III. Segundo Korkolopoulou et al. (2000), em tecidos normais, a P27 age bloqueando a proliferação celular, e a redução nos níveis desta proteína está associada a um aumento na atividade mitótica celular. Neste estudo, não se identificaram aberrações na expressão desta proteína nos tecidos examinados.

Quanto à proteína BMP4, não houve diferença estatisticamente significativa quanto à frequência de expressão nas lesões do Grupo I e do Grupo III; foi detectada em três casos do Grupo III, tendo expressão no tecido conjuntivo, entre as fibras colágenas. Mostrou diferença significativa na frequência de expressão quando se comparou o Grupo II com os demais grupos, apresentando-se tanto no tecido ósseo como no citoplasma dos osteoblastos. As lesões do Grupo III apresentam seus constituintes num estágio mais maduro em relação às do Grupo I, fato verifi-

cado pela semelhança de imunomarcção. O mesmo não acontece no Grupo II, porque o padrão de imunomarcção encontrado, especialmente nas estruturas mineralizadas, apresentou-se distinto nas lesões estudadas.

Os resultados da expressão imunoistoquímica de localização da BMP4 mostraram que as lesões ossificantes da gengiva apresentaram marcação especialmente junto às células relacionadas ao tecido mineralizado, o que foi verificado em todos os casos do Grupo II. Esse aspecto coincide com os achados de Yang et al. (1993), os quais demonstraram que a localização da BMP4 nos émulis fibrosos calcificantes ocorreu em virtude da presença de células osteoprogenitoras (osteoblastos) potencialmente ativas, originadas no ligamento periodontal. Os mesmos autores encontraram também, em menor número, marcação para BMP4 nas fibras do tecido conjuntivo gengival, que não está associado com fibras periodontais. Concluíram que aspectos pronunciados de inflamação crônica com ou sem dilatação de capilares não são um fenômeno incomum nos émulis fibrosos calcificantes e que, nessas áreas, não ocorre formação óssea. Por essa razão, sugere-se, com base nos aspectos histopatológicos e de expressão da proteína BMP4, que geralmente a ossificação não ocorre nas áreas associadas com maciça infiltração de células inflamatórias crônicas e dilatação de vasos capilares.

A ocorrência de semelhança clínica e histopatológica entre fibromas ossificantes periféricos e granulomas piogênicos levou a que se pensasse que os granulomas piogênicos apresentassem maturação fibrosa e subsequente mineralização e evolução para o FOP (NEVILLE et al., 2004). Entretanto, demonstrou-se (WRIGHT, JENNINGS, 1979; BUCHNER e HANSEN, 1987) a origem do tecido mineralizado no fibroma ossificante periférico a partir do periosteio ou do ligamento periodontal. No presente estudo, a positividade para BMP4 também foi demonstrada, a exemplo dos achados de YANG et al., (1993).

Os aspectos observados neste estudo indicam uma origem distinta para as entidades classificadas como Grupo II - derivadas do ligamento periodontal - e as lesões do Grupo III - originadas a partir do tecido conjuntivo gengival. Estas lesões (Grupo III) poderiam derivar de um processo de deposição de colágeno e proliferação fibroblástica a partir do GP, conforme sugerem Araújo e Araújo (1984) e Shafer et al. (1987). Essa constatação confirma a hipótese de evolução do granuloma piogênico, o qual, num processo de maturação, poderia atingir o aspecto histopatológico verificado nas lesões do Grupo III.

Verificou-se através do uso dos anticorpos para ciclina B1, Rb1, P27, BMP4 e LCA que o padrão de imunomarcção nas lesões do Grupo I foi diferente do padrão observado no Grupo II. Contudo, constatou-se semelhança no padrão de imunomarcção das lesões do Grupo I com o Grupo III. A expressão das proteínas através da técnica imunoistoquímica utilizada aponta para uma maior atividade proliferativa das células no Grupo I em relação ao Grupo II, tanto pela menor frequência de expressão da proteína P27 como pela maior frequência de expressão da ciclina B1 no Grupo I e, também, pelas diferenças significativas com os marcadores BMP4 e LCA entre os dois grupos.

De acordo com os resultados obtidos pela expressão das proteínas utilizando os anticorpos LCA, ciclina B1, Rb1, P27 e BMP4, confirmou-se que as lesões do Grupo I, do Grupo II e do Grupo III representam entidades benignas, por não terem apresentado superexpressão, tampouco inativação das proteínas reguladoras de ciclo celular.

A análise conjunta dos dados histopatológicos e dos marcadores da proliferação celular confirma a teoria de que as lesões analisadas no Grupo II têm sua origem em células mesenquimais osteoprogenitoras do ligamento periodontal, o que não pode ser inferido para a origem das lesões do Grupo III. Este estudo também indica que as lesões do Grupo I e do Grupo III apresentam expressão de pro-

teínas semelhante e que a atividade proliferativa das células (angioblastos e fibroblastos) que compõem o estroma das lesões no Grupo III é maior que a atividade das lesões do Grupo II, como demonstrado pela expressão de proteínas indicadoras de proliferação celular empregadas neste estudo.

Abstract

It was performed an expression analysis of the proteins cyclin B1, Rb1(Retinoblaston Gen 1), P27(Protein 27), BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) and LCA (Leucocitary Commun Antigen), by the doublestain immunohistochemical method, in 24 cases of proliferative gingival lesions divided into three groups, according to their histopathological features: Group I (pyogenic granuloma), Group II (peripheral ossifying fibroma) and Group III (pyogenic granuloma with calcification) in consonance with the inclusion criteria of this study. LCA was employed as first primary antibody in all specimens. The genes cyclin B1, P27 and Rb have a critical role in the regulation of the transition in phases of cellular cycle, which are often altered in various neoplastic entities. Thus, the aim of this study was to compare the expression of such proteins among three lesions, in order to provide information on the proliferative activity of cells present in the tissue. The antibody anti-BMP4 was employed with the aim of assessing and comparing its expression in the stroma of lesions which produce mineralized material. Results showed similarity in relation to the expression of the proteins cyclin B1, Rb1, P27 and LCA, in the lesions of Groups I and III, and distinct expression in relation to lesions of Group II. The expression of the protein BMP4 in the lesions of Group II and III suggests different origins for the mineralized material of such lesions. The negative expression of protein BMP4 in lesions of Group I confirms the absence of osteoprogenitor cells in their stroma.

Key words: pyogenic granuloma, peripheral ossifying fibroma, cyclin B1, Rb1, P27, BMP4, LCA.

Agradecimento

Os autores agradecem à professora Maria Dileta Cecchetti pela orientação na análise estatística do trabalho.

Referências

- ARAÚJO, N. S.; ARAÚJO, V. C. *Patologia bucal*. São Paulo: Artes Médicas, 1984.
- BUCHNER, A.; HANSEN, L. S. The histomorphologic spectrum of peripheral ossifying fibroma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 63, n. 4, p. 452-461, Apr.1987.
- COOKE, B. E. D. The fibrous epulis and the fibro-epithelial polyp: their histogenesis and natural history. *Brit Dent J*, v. 93, n. 1, p. 305-309, 1952.
- JANEWAY, C. A. et al. *Imunobiologia*. O sistema imune na saúde e na doença. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- KENDRICK, F.; WAGGONER, W. F. Managing a peripheral ossifying fibroma. *Journal of Dentistry for Children*, v. 63, n. 2, p. 135-138, Mar./Apr. 1996.
- KFIR, Y.; BUCHNER, A.; HANSEN, L. S. Reative lesions of the gingiva. A clinicopathological study of 741 cases. *J Periodontol*, v. 51, n. 11, p. 655-661. Nov. 1980.
- KORKOLOPOULOU, P. et al. Cell cycle regulators in bladder cancer: a multivariate survival study with emphasis on p27kipl. *Human Pathol*, v. 31, n. 6, p. 751-760. June 2000.
- LEE, J. Disponível em <<http://www.fhs.mcmaster.ca/grad/medsci/research/faculty/leej.htm>> Dec. 2000. Acesso em: 4 jan. 2002.
- MASUHARA, K. et al. Use of monoclonal antibody to detect bone morphogenetic protein. (BMP-4). *Bone*. v. 16, n. 1, p. 91-96, Jan. 1995.
- NEVILLE, B. W. et al. *Patologia oral e maxilofacial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- PINES and HUNTER. Subcellular localisation of cyclin B1 during interphase. *EBOJ*, v. 13, n. 1, p. 3772-3781, 1994.
- SHAFFER, W. G.; HINE, M. K.; LEVY, B. M. *Tratado de patologia bucal*. 4. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1987.
- SIEGEL, S. *Estatística não-paramétrica*. São Paulo. Mc Graw-Hill do Brasil, 1975.
- TANGUAY, D. et al. B cell antigen receptor-mediated activation of cyclin-dependent retinoblastoma protein kinases and inhibition by co-cross-linking with Fc gamma receptors. *J Immunol*, v. 163, n. 6, p. 3160-3168. Sept. 1999.
- TREMBLEY, J. H. et al. Differential regulation of cyclin B1 RNA and protein expression during hepatocyte growth in vivo. *Cell Growth Differ*. v. 7, n. 7, p. 903-916, July 1996.
- WRIGHT, B. A.; JENNINGS, E. H. Oxitalan fibers in peripherall odontogenic fibromas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 48, n. 5, p. 451-453, Nov. 1979.
- YANG, L. J. et al. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic protein (BMP) in calcifying fibrous epulis. *J Oral Pathol Med*, v. 22, n. 3, p. 406-410, Mar. 1993.

Endereço para correspondência

Soliete Oliveira da Silva
Rua Padre Nóbrega, 475/301 – Bairro Lucas Araújo Passo Fundo RS
CEP: 99070-142
Fone: 3312-3800 e-mail: soluete@upf.br