

# CULTURA E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS DERIVADAS DE LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO\*

## CULTURE AND CHARACTERIZATION OF HUMAN DERIVED PERIODONTAL LIGAMENT CELLS

### Adriana Campos Passanezi SANT'ANA

Doutora em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP; Professora Adjunta I do curso de Odontologia da Universidade Paulista (UNIP) – Campus Bauru.

### Márcia Martins MARQUES

Professora Livre-Docente da disciplina de Endodontia, Departamento de Dentística, da FO-USP.

### Emildre Costa BARROSO

Doutora em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP; Professora das disciplinas de Periodontia e Clínica Integrada da Universidade Estácio de Sá – RJ.

### Euloir PASSANEZI

Professor Titular e Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível de Doutorado, da FOB – USP.

\* Trabalho de pesquisa vinculado à Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru – USP como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de Periodontia pela aluna Adriana C. P. Sant'Ana.

Os estudos *in vitro* para análise da viabilidade de procedimentos que visem a regeneração periodontal possibilitam o controle do microambiente e a homogeneidade dos tipos celulares envolvidos. O objetivo deste estudo foi estabelecer e caracterizar uma linhagem contínua de células derivadas de ligamento periodontal (LP) humano. Estas células foram obtidas através da técnica do “explante” de tecido removido por raspagem do terço médio das raízes de 3<sup>os</sup> molares extraídos por razões não-periodontais de três pacientes saudáveis, sem sinais clínicos ou radiográficos de doença periodontal. Posteriormente, as células foram caracterizadas através de microscopia de luz (contraste de fase), padrão de crescimento, testes imunohistoquímicos, histoquímicos e enzimáticos para confirmação da sua natureza. Morfológicamente, apresentaram aspecto fusiforme ou estrelado, compatível com células fibroblásticas. Houve marcação positiva para anticorpos contra vimentina, osteonectina, fibronectina, sialoproteína óssea II e tenascina e negativa para anticorpos anti-citoqueratina (AE1/AE3), actina de músculo liso e colágeno III. A presença de nódulos mineralizados sintetizados *in vitro* pelas células foi confirmada pelo teste de von Kossa. Esses resultados, em conjunto, indicaram que as células cultivadas, denominadas FL2, eram derivadas de LP e, portanto, poderiam ser utilizadas em estudos *in vitro*.

**UNITERMOS:** Ligamento periodontal, caracterização; Cultura primária, *in vitro*.

## INTRODUÇÃO

A regeneração periodontal ocorre quando as células presentes na área afetada após a cura da ferida são do mesmo tipo e apresentam as mesmas características funcionais daquelas originalmente existentes<sup>2,20</sup>. Vários estudos<sup>2,09,10,12-14,19-21,23,25-26</sup> têm mostrado que o repovoamento da região da ferida cirúrgica periodontal por células oriundas do

epitélio juncional (EJ) resulta na formação de EJ longo, enquanto que se as células se originam do tecido conjuntivo gengival, ocorre reparo, com formação de fibras colágenas orientadas paralelamente ao longo-eixo do dente, e, quando se originam do tecido ósseo, levam ao desenvolvimento de anquilose ou reabsorção radicular. Apenas quando células oriundas do ligamento periodontal (LP) ocupam a região comprometida ocorre

neoformação de osso, cemento e LP orientado perpendicularmente à superfície radicular.

Alguns trabalhos evidenciaram a existência de diferentes populações celulares no LP<sup>5,21</sup> e estabeleceram diferenças importantes entre fibroblastos derivados de LP e de tecido conjuntivo gengival<sup>27,33</sup>. A heterogeneidade das células presentes no LP resulta em diferentes características de crescimento, meia vida e síntese protéica, com algumas células apresentando características próprias de osteoblastos e outras de fibroblastos. Os eventos básicos que conduzem à regeneração parecem ser estimulados por um “sinal” que levaria o sistema celular a entrar novamente no ciclo celular. A identificação desses “sinais” e eventos celulares é fundamental para a compreensão da regeneração periodontal<sup>16</sup>.

Assim, os objetivos deste estudo foram estabelecer e caracterizar uma linhagem contínua de células derivadas de LP humano, permitindo sua posterior utilização em diversos estudos envolvendo este tipo celular.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento e cultura das células derivadas de LP humano

Para derivação das células de LP humano, foram obtidos três 3<sup>os</sup> molares de pacientes adultos jovens (18-30 anos), clinicamente saudáveis, submetidos a tratamento odontológico na Clínica de Cirurgia da FO-USP. Os dentes foram extraídos por razões ortodônticas ou preventivas (não periodontais), sem evidências clínicas ou radiográficas de perda óssea ou de inserção periodontal. O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB-USP, sob número 203/01, tendo sido integralmente aprovado.

Imediatamente após a extração, os dentes foram acondicionados em meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), contendo 200 U/mL de penicilina G potássica, 200 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 20 µg/ml de anfotericina B (Sigma Co., EUA) em pH 7,4 e transportados para o laboratório de cultura de células da FO-USP.

Os dentes foram, então, colocados em placas de Petri contendo solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA), lavados e dissecados finamente com 2 lâminas de bisturi. Para a remoção das células do LP, raspou-se cuidadosamente o terço médio das raízes, evitando

a contaminação da cultura por fibroblastos gengivais ou pulpares<sup>32</sup>. Os fragmentos teciduais foram posicionados em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> contendo DMEM suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% e solução antibiótica-antimicótica (Sigma Co., EUA) a 1% em pH 7,4 (DMEM-S) e incubados em estufa para cultura tecidual contendo atmosfera úmida composta de 95% de ar e 5% CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C.

Os fragmentos teciduais menores foram posicionados em tubo de ensaio contendo 10 mL de PBSA e centrifugados durante 3 minutos. O PBSA foi aspirado e o precipitado de células resultante foi ressuspenso em 1 mL de DMEM-S e transferido para frasco de cultura tecidual de 25 cm<sup>2</sup>, mantido nas condições anteriormente mencionadas.

Durante a primeira semana de incubação, foi acrescentado gradativamente 1 mL de DMEM-S diariamente até que se alcançasse o total de 5 mL no frasco. Posteriormente, o meio de cultivo foi trocado a cada 2 dias até que o crescimento atingisse uma monocamada subconflente (70% da área cultivável recoberta por células), quando então as células foram separadas enzimaticamente (solução de tripsina – Cro 25%, EDTA 1mM em PBSA) e cultivadas em frascos progressivamente maiores. A linhagem contínua então obtida foi denominada de FL2.

### Morfologia

O aspecto morfológico das células FL2 foi monitorado durante todo experimento em microscópio de contraste de fase e comparado com dados obtidos de literatura para comprovação da natureza das células cultivadas.

### Características de crescimento

Para determinação das características de crescimento das células FL2, o número de células vitais presentes em placas de Petri de 35 mm inicialmente cultivadas com 10<sup>3</sup> células/placa foi determinado pela técnica de exclusão de células não vitais coradas por solução de azul de Trypan (Sigma Co., EUA), seguindo as recomendações de Frehney<sup>8</sup>. Brevemente, após aspiração do meio de cultura, lavagem com PBS e incubação com tripsina por 3 minutos, as células foram centrifugadas por 3 minutos. O extrato de células obtido foi ressuspenso em 1 mL de PBS. Para a contagem, foi utilizado 0,1 ml da suspensão celular que, por sua vez, foi adicionado a 0,1 mL de azul de Trypan e 0,8 mL de

PBSA. Esta suspensão celular foi transferida para a câmara de Neubauer com auxílio de pipeta Pasteur e as células foram contadas, excluindo-se aquelas que se apresentaram coradas de azul (células não viáveis). Para o cálculo do número de células no frasco foi utilizada a seguinte equação matemática:  $NC \times D \times 10^4 / \#Q$ , onde NC= número de células vitais contadas; D= diluição da amostra (10) e #Q= número de quadrados da câmara de Neubauer usados para contagem das células. O experimento foi realizado em triplicatas e as contagens realizadas após 2, 5, 7 e 9 dias do plaqueamento inicial, permitindo o estabelecimento de uma curva de crescimento para as células FL2.

### Caracterização imunohistoquímica

As células FL2 foram cultivadas sobre lamínulas de vidro, posicionadas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro e mantidas em estufa para cultura tecidual, conforme anteriormente mencionado. Para a execução dos testes, realizou-se a fixação da amostra por solução de paraformaldeído a 1% em PBSA durante 10 minutos à temperatura ambiente, seguida de lavagem dupla em PBSA e permeabilização com detergente (Triton X 100 – solução a 0,5% em PBSA) por 10 minutos, para permitir a penetração do anticorpo testado. As lamínulas foram incubadas durante 45 minutos com o anticorpo primário. A seguir, foram novamente lavadas em PBSA, incubadas com os anticorpos

secundários conjugados a fluoresceína, lavadas em PBSA e, por último, em água destilada. Posteriormente, foram montadas em lâminas de vidro (Meio de montagem: Prolong<sup>r</sup> Antifade Kit, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA.) para análise dos resultados. Como controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por PBS e, como controle positivo, foi realizada reação contra osteonectina (ON) em linhagem celular obtida de fragmento de gengiva humana (células FMM1)<sup>29</sup>. Os anticorpos utilizados, suas diluições e origens estão expressos na Tabela 1.

### Caracterização histoquímica

Para identificar se as células FL2 (passagem 5) produziam nódulos mineralizados *in vitro*, foi realizado o teste de von Kossa. Para tanto, o meio de cultura foi removido e foi acrescentada à amostra solução de formol a 10% para fixação durante 10 minutos. A solução foi removida e as células foram lavadas com PBS por 10 minutos adicionais. Acrescentou-se, então, solução de nitrato de prata a 5%, com exposição à luz ultra-violeta durante 10-60 minutos. As células foram novamente lavadas com PBS (3 vezes), imersas em solução de hipossulfito de sódio 5% por 2-3 minutos, coradas com solução de safranina (0,5 – 10%) e montadas em lâminas de vidro.

**TABELA 1-** Anticorpos primários e secundários utilizados para caracterização imunohistoquímica das células FL2

ANTICORPO 1º	MARCA	DILUIÇÃO	ANTICORPO 2º
Vimentina (VM)	Sigma Co.	1:50	Ig para camundongo com fluoresceína
AE1/AE3	Biogenex	1:20	Ig para coelho com fluoresceína
Osteonectina (ON)	Sigma Co.	1:50	Ig para camundongo com fluoresceína
BSP-2	Sigma Co.	1:50	Ig para coelho com fluoresceína
Fibronectina (FN)	Dako	1:50	Ig para coelho com fluoresceína
Actina alfa de			
músculo liso (AML)	Biogenex	1:20	Ig para camundongo com fluoresceína
Tenascina (TN)	Dako	1:50	Ig para camundongo com fluoresceína
Colágeno III (Col III)	Biogenex	1:50	Ig para camundongo com fluoresceína
Controle negativo	Sigma Co.	PBS	Ig para camundongo com fluoresceína
Controle positivo -			
Osteonectina (ON)*	Sigma Co.	1:50	Ig para coelho com fluoresceína

\* Linhagem de fibroblastos derivados de mucosa (células FMM1) – Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – USP. Onde: PBS- SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO SALINA; AE1/AE3- CITOQUERATINAS; BSP-2- SIALOPROTEÍNA ÓSSEA-2.

### Caracterização enzimática

Para detecção de atividade de fosfatase alcalina, o meio de cultura de placa de Petri contendo 2 lâminulas de vidro, sobre as quais foram cultivadas células FL2 na passagem 4 (uma controle e uma experimental), foi removido e as células foram lavadas com solução de Tris (Sigma Co., EUA) em pH 7,4. A seguir, acrescentou-se solução de paraformaldeído a 1% em temperatura ambiente por 10 minutos e, posteriormente, procedeu-se à lavagem das amostras com Tris por mais duas vezes. As amostras foram então incubadas com solução de Triton-X durante 15 minutos à temperatura ambiente e, novamente, lavadas (2 vezes) com solução de Tris. Isto posto, acrescentou-se o cromógeno diluído em substrato para fosfatase alcalina (Naphtol Phosphate in Tris Buffer – Biogenex, San Ramon, Ca, USA) sobre as amostras durante 1 hora em ambiente livre de luz. Após este período, a solução foi removida e as amostras foram lavadas em água destilada durante 10 minutos e coradas com solução de hematoxilina durante 3 minutos. Para o controle negativo, as células aderidas à lamínula foram inativadas pelo calor através de sua imersão em água fervente por 1 min antes da incubação com o substrato<sup>6</sup>.

### RESULTADOS

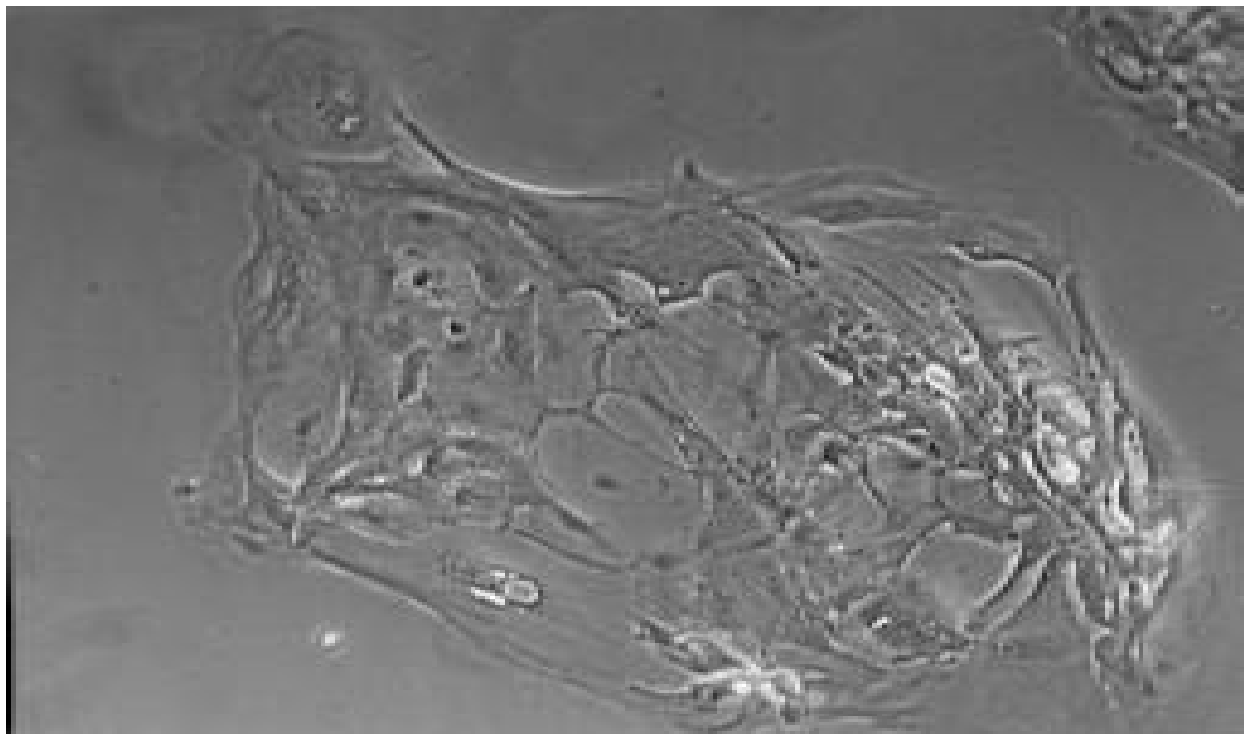
Após o estabelecimento da cultura primária pela técnica do “explante”, foram observadas, em microscópio de contraste de fase, células fusiformes migrando dos fragmentos teciduais dentro de 14 dias (Figura 1). Populações celulares subconfluentes foram estabelecidas em 3-4 semanas. Morfologicamente, sob microscopia de contraste de fase, as células FL2 de culturas subconfluentes exibiram aspecto alongado ou fusiforme.

#### Taxa de crescimento

As características de crescimento das células FL2 estão expressas no gráfico da Figura 2. As células apresentaram crescimento logarítmico até 5 dias após o plaqueamento, quando o cultivo atingiu um platô.

#### Caracterização imunohistoquímica, histoquímica e enzimática

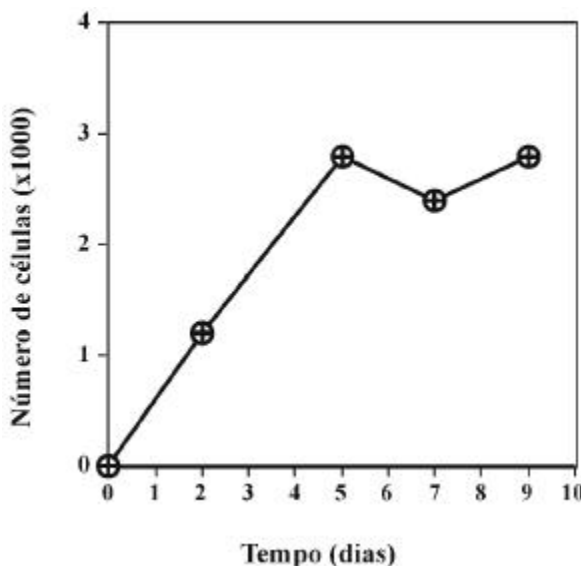
Os testes imunohistoquímicos realizados mostraram marcação positiva para vimentina (VM), fibronectina (FN), sialoproteína óssea II (BSP<sub>2</sub>), osteonectina (ON) e tenascina (TN) e negativa para colágeno tipo III (Col III), actina de músculo liso



**FIGURA 1-** Fotomicrografia de fase do cultivo primário das células FL2. Observe restos do tecido periodontal e as células fusiformes saindo desse “explante” e aderindo ao plástico de cultivo. Individualmente as células são fusiformes ou estreleárias e exibem longos prolongamentos citoplasmáticos

(AML) e citoqueratina (AE1/AE3). As células FMM1 não apresentaram marcação positiva para ON.

O teste de von Kossa realizado revelou a presença de nódulos mineralizados sintetizados pelas células cultivadas. A análise da atividade de fosfatase alcalina não apresentou positividade nas células FL2, bem como no controle negativo.



**FIGURA 2-** Gráfico representando a curva de crescimento das células FL2. Cada ponto foi obtido através da mediana de três contagens independentes. Observe que há um crescimento contínuo das células até 5 dias após o plaqueamento e então atinge um platô

## DISCUSSÃO

Neste estudo, foi estabelecida cultura primária de células derivadas de LP humano (células FL2) a partir de fragmentos teciduais removidos do terço médio de raízes de molares extraídos por razões não periodontais. Morfologicamente, observadas sob microscopia de contraste de fase, mostraram aspecto fibroblástico, com fenótipo alongado ou estrelado e longos prolongamentos citoplasmáticos, achados que estão de acordo com outros estudos publicados na literatura para células de ligamento periodontal *in vitro*<sup>2,4,7</sup> e *in vivo*<sup>30</sup>.

Ao analisar-se o padrão de crescimento dessas células, observou-se maior taxa de crescimento até o 5º dia em cultivo, quando o crescimento atingiu

um platô, talvez em função do início de atividade de síntese protéica, que pode ocorrer ao redor do 4º dia, conforme mencionado por Wikesjö et al.<sup>37</sup> (1991) e Wang et al.<sup>35</sup> (1994). A taxa de proliferação das células manteve-se homogênea até a 10ª passagem aproximadamente, quando começaram a proliferar mais lentamente, possivelmente refletindo perda das propriedades naturais das células *in vivo*.

Até os dias atuais, não existem marcadores específicos para fibroblastos de LP<sup>19</sup>. Entretanto, um conjunto de características pode identificar as células derivadas de LP, que apresentam, *in vitro* e *in vivo*, uma heterogeneidade de tipos celulares indistinguíveis entre si ultra-estruturalmente. As células cultivadas podem apresentar características típicas de fibroblastos ou osteoblastos. As células FL2 apresentaram marcação positiva para VM<sup>7</sup>, FN<sup>7,33</sup>, TN<sup>7</sup>, ON<sup>16,17,24,31,34,36</sup> e BSP-2<sup>17,18,30,33</sup>, sendo as últimas proteínas específicas de osteoblastos. A BSP-2 foi identificada *in vivo* em maior quantidade do que *in vitro*, especialmente localizada no cimento e no osso alveolar<sup>16</sup>, visto ser uma proteína correlacionada à adesão celular<sup>11</sup> e que, possivelmente, exerce papel importante no início da mineralização<sup>24</sup>. Já a ON parece estar presente em maior quantidade *in vitro* do que *in vivo*<sup>16</sup>, sendo que sua função ainda não está totalmente estabelecida.

Outra característica típica de osteoblastos é a formação de nódulos mineralizados *in vitro*, identificada positivamente neste estudo pelo teste de von Kossa. Tanto o método de identificação quanto a presença dos nódulos mineralizados estão de acordo com outros artigos publicados<sup>1,3,22</sup>. Melcher et al.<sup>22</sup> sugeriram que o tecido mineralizado depositado *in vitro* tinha aspecto de cimento celular ou de tecido ósseo *in vivo*.

Não houve identificação de atividade de fosfatase alcalina, embora outros autores a tenham observado<sup>15,16,27,32</sup>. No entanto, a positividade observada por outros autores foi obtida especialmente após a adição de dexametasona no meio de cultivo celular, indução que não foi realizada neste trabalho, por não ser nosso objetivo induzir as células, mas sim obter uma linhagem celular para uso futuro em pesquisas em Periodontia. Além disso, os resultados aqui apresentados estão de acordo com aqueles apresentados por Chomette et al.<sup>7</sup> e, mais uma vez, refletem a heterogeneidade das populações celulares do LP, com a coexistência de fibroblastos, osteoblastos e cementoblastos. Adicionalmente, os testes foram feitos na passagem 5, quando as células cultivadas perderam parte de suas características

naturais, o que poderia justificar tanto a ausência de atividade de fosfatase alcalina quanto a negatividade de marcação para actina de músculo liso e colágeno III, visualizada por Chomette et al.<sup>7</sup>, mas contestada por Lekic et al.<sup>16</sup>. Também não houve marcação positiva para citoqueratina AE1/AE3, como também mencionado por Chomette et al.<sup>7</sup> e Ragnersson, Carr e Daniel<sup>28</sup>.

Esses resultados, quando analisados em conjunto, mostram que as células FL2 apresentam características típicas de células derivadas de LP humano, visto que fibroblastos gengivais não demonstram propriedades estruturais típicas de células mineralizantes, como a expressão de ON e BSP-2 e a formação de nódulos minerais *in vitro*. Dessa forma, a linhagem FL2 poderá, no futuro, ser utilizada para avaliação de diferentes tratamentos e manipulações biotecnológicas que favoreçam a regeneração dos tecidos periodontais.

## ABSTRACT

*In vitro* studies to evaluate the viability of procedures leading to periodontal regeneration provide microenvironment control and homogeneity of involved cell types. The aim of this research was to establish and characterize a human periodontal ligament (PDL) cell lineage. The cells were removed by scraping the mid-third of third molar roots extracted for non periodontal reasons from healthy donors for non periodontal reasons. Following this, the cells were morphologically under light microscopy (phase contrast), growth pattern and immunohistochemical, histochemical and enzymatic tests that confirmed the cell nature. Morphologically, the cells showed an elongated or spindle-like shape, compatible with fibroblast-like cells. There was a positive staining for VM, ON, FN, BSP<sub>2</sub> and TN and negative for antibodies against AE1/AE3, AML and Col III. The presence of mineral nodule secreted by FL2 cells *in vitro* was confirmed by von Kossa's method. These results together suggest that the cultivated cells – FL2 cells - are derived from PDL and, therefore, could be used in *in vitro* studies.

**UNITERMS:** Periodontal ligament, characterization; Primary culture, *in vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, Foster RA, Somerman MJ. Human periodontal ligament cells initiate mineral-like nodules *in vitro*. *J Periodontol* 1991; 62(8):500-3.
- 2- Beertsen W, Mc Culloch C A G, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol* 2000 1997; 13:20-75.
- 3- Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed *in vitro* from enzymatically-released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int* 1986; 38(3):143-54.
- 4- Berkovitz BKB, Shore RC. Cells of the periodontal ligament. In: Berkovitz BKB, Moxham BJ, Newman HN. The periodontal ligament in health and disease. 2<sup>nd</sup>.ed. Barcelona : Mosby Wolfe, 1995; Cap. 1, p. 9-33.
- 5- Bordin S, Narayanan AS, Reddy J, Cleveland D, Page RC. Fibroblast subtypes in the periodontium. A possible role in connective tissue regeneration and periodontal reattachment. *J Periodontal Res*, 1984 Nov; 19(6):642-4.
- 6- Burnstone MS. In: Symposium on calcification in biological system. s.l.: DC Symposium Publication, 1960; p. 225-7.
- 7- Chomette G, Auriol M, Armbruster D, Szpirglas H, Vaillant JM. Les cellules du ligament parodontal humain normal. Étude ultrastructurale, histoenzymologique et immunocytochimique sur cultures *in vitro*. *J Biol Buccale*, 1987; 15(4):217-24.
- 8- Freshney RI. Culture of animal cells : a manual of basic technique. 3<sup>rd</sup>. ed. New York : Wiley-Liss, 2001.
- 9- Gottlow J. Principles of regenerative therapy. In: Genco RJ et al. (eds). Molecular pathogenesis of periodontal disease. Washington : ASM Press, 1994; Cap.31, p. 393-402.
- 10- Gottlow J, Nyman S, Karring T. Healing following citric acid conditioning of roots implanted into bone and gingival connective tissue. *J Periodontal Res* 1984; 19(6): 214-20.
- 11- Hunter G K, Kyle CL, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J* 1994 Jun15; 300(Pt3):723-8.
- 12- Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissues. *J Clin Periodontol* 1980 Apr; 7(2):96-105.
- 13- Karring T, Nyman S; Gottow J, Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration – animal and human studies. *Periodontol* 2000 1993 Feb; 1:26-35.
- 14- Karring T, Isidor F, Nyman S, Lindhe J. New attachment formation on citric acid and non-citric acid treated roots. *J Periodontal Res* 1984 Nov; 19(6):666-9.
- 15- Kuru L, Griffiths GS, Petrie A, Olsen J. Alkaline phosphatase activity is upregulated in regenerating human periodontal cells. *J Periodontal Res* 1999 Feb; 34(2):123-7.

- 16- Lekic P, Rojas J, Birek C, Tenenbaum H, McCulloch CA. Phenotypic comparisons of periodontal cells in vivo e in vitro. *J Periodont Res* 2001 Apr; 71(9): 71-9.
- 17- Lekic P, Sodek J, McCulloch CAG. Osteopontin and bone sialoprotein expression in regenerating rat periodontal ligament and alveolar bone. *Anat Rec* 1996 Jan; 244(1):50-8.
- 18- MacNeil RL, Sheng N, Strayhorn C, Fisher LW, Somerman MJ. Bone sialoprotein is localized to the root surface. *J Bone Miner Res* 1994; 9(10):1597-606.
- 19- McCulloch CAG. Origins and functions of cells essential for periodontal repair: the role of fibroblasts in tissue homeostasis. *Oral Dis* 1995 Dec; 1(4): 271-8.
- 20- McCulloch CAG. Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontol* 2000 1993 Feb; 1:16-25.
- 21- McCulloch CAG, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodont Res* 1991 May; 26(3 Pt1):144-54.
- 22- Melcher A H, McCulloch CA, Cheong T, Nemeth E, Shiga A. Cells from bone synthesize cementum-like and bone-like tissue in vitro and may migrate into periodontal ligament in vivo. *J Periodontal Res* 1987; 22(3): 246-7.
- 23- Melcher A H. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976 May; 47(5): 256-70.
- 24- Nohutcu RM, McCauley Lk, Shigeyama Y, Somerman MJ. Expression of mineral-associated proteins by periodontal ligament cells: in vitro vs. ex vivo. *J Periodontal Res* 1996 Jul; 31(5):369-72.
- 25- Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of periodontal ligament: an experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol* 1982 Jun; 9(3):257-65.
- 26- Nyman S, Karring T, Lindhe J, Planten S. Healing following implantation of periodontitis affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol* 1980 Oct; 7(5): 394-401.
- 27- Piche JE, Carnes DL, Graves DT. Initial characterization of cells derived from human periodontia. *J Dent Res* 1989 May; 68(5):761-7.
- 28- Ragnarsson B, Carr G, Daniel JC. Isolation and growth of human periodontal ligament cells in vitro. *J Dent Res* 1985 Aug; 64(8): 1026-30.
- 29- Ruano R, Jaeger RG, Jaeger MMM. Effect of a ceramic and a non-ceramic hydroxyapatite on cell growth and procollagen synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2000 Apr; 71(4): 540-5.
- 30- Somerman MJ, Sauk JJ, Foster RA, Norris K, Dickerson K, Argraves WS. Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. *J Periodontal Res* 1991 Jan; 26(1):10-6.
- 31- Somerman MJ, Young MF, Foster RA, Moehring JM, Imm G, Sauk JJ. Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. *Arch Oral Biol* 1990; 35(3):241-7.
- 32- Somerman MJ, Foster RA, Imm GM, Sauk JJ, Archer SY. Periodontal ligament cells and gingival fibroblasts respond differently to attachment factors in vitro. *J Periodontol* 1989 Feb; 60(2):73-7.
- 33- Somerman MJ, Fisher LW, Foster RA, Sauk JJ. Human bone sialoprotein I and II enhance fibroblastic attachment in vitro. *Calcif Tissue Int* 1988 Jul; 43(1):50-3.
- 34- Takano-Yamamoto T, Takemura T, Kitamura Y. Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *J Histochem Cytochem* 1994 Jul; 42(7):885-96.
- 35- Wang HL, Pappert TD, Castelli WA, Chiego DJ Jr, Shyr Y, Smith BA. The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: an autoradiographic study on dogs. *J Periodontol* 1994 May; 65(5):429-36.
- 36- WASI S, Otsuka K, Yao KL, Tung PS, Aubin JE, Sodek J, Termine JD. An osteonectin-like protein in porcine periodontal ligament and its synthesis by periodontal ligament fibroblasts. *Can J Biochem Cell Biol* 1984 Jun; 62(6):470-8.
- 37- WIKESJÖ U, Crigger M, Nilveus R, Selvig KA. Early healing events at the dentin-connective tissue interface. Light and transmission electron microscopic observations. *J Periodontol* 1991 Jan; 62(1):5-14.

**Endereço para correspondência:**

Al. Otávio Pinheiro Brisolla 9-75  
Disciplina de Periodontia  
Faculdade de Odontologia de Bauru – USP  
CEP: 17043-101 – Bauru –SP  
Tel: (014) 235-8278  
e-mail: drisantana@yahoo.com.br