UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM PERIODONTIA

CAROLINA DE MORAES REGO MANDETTA

**Avaliação *in vitro* de matriz colágena suína como arcabouço
tridimensional para cultivo de fibroblastos gengivais**

Ribeirão Preto
2012

CAROLINA DE MORAES REGO MANDETTA

**Avaliação *in vitro* de matriz colágena suína como arcabouço
tridimensional para cultivo de fibroblastos gengivais**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Bazan Palioto

VERSÃO CORRIGIDA

A versão original se encontra disponível na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP

Ribeirão Preto
2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Mandetta, Carolina de Moraes Rego

Avaliação *in vitro* de matriz colágena suína como arcabouço tridimensional para cultivo de fibroblastos gengivais. Ribeirão Preto, 2012.

128 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Periodontia.

Versão corrigida da Dissertação. A versão original se encontra disponível na Biblioteca da Unidade sede do Programa.

Orientadora: Palioto, Daniela Bazan

Cultura de células. 2. Fibroblastos gengivais. 3. Engenharia de tecidos. 4. Matriz colágena suína.

1. Matriz colágena suína. 2. Fibroblastos gengivais. 3. Cultura tridimensional. 4. Engenharia tecidual.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carolina de Moraes Rego Mandetta

Avaliação *in vitro* de matriz colágena suína como arcabouço tridimensional para cultivo de fibroblastos gengivais

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Periodontia.

Aprovado em: ____ / ____ / 2012

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A você que sempre renunciou os seus desejos próprios em favor dos meus e dos meus irmãos. Você fez de meus sonhos os seus, sem medir esforços para realizá-los. Iluminou meu caminho com amor e extrema dedicação. A você, minha eterna gratidão e todo o meu amor... AMO VOCÊ, MÃE.

Aos meus irmãos **Vicente, Carla e Helio**, que embora à distância, tenho a certeza de que seremos companheiros por toda a vida. Recentemente, mais um integrante, nosso anjinho **Vicente Filho**, que veio para nos completar ainda mais e trazer muita alegria.

Aos meus queridos avós **Sydney e Nilza**, grandes exemplos de perseverança, amor e dedicação. Não tenho palavras para agradecer por todo o apoio e tudo o que fazem por nós. Certamente contribuíram muito para esta conquista.

Agradecimientos

À **Deus**, por me dar o Dom da vida, força, amparo, proteção, pela possibilidade de empreender esse caminho evolutivo, por me proporcionar tantas oportunidades e colocar em minha vida pessoas especiais.

À minha orientadora, **Profª Drª Daniela Bazan Palioto**, pelos ensinamentos, apoio durante todo o programa e por confiar em minha capacidade, permitindo meu avanço profissional.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ao **Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Jr**, pelo exemplo de competência, disciplina e dedicação. Ao **Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi**, pelo entusiasmo e amor a profissão contagiantes. Ao **Prof. Dr. Mário Taba Júnior**, pelas conversas agradáveis sobre pesquisa. Ao **Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza**, pelos conselhos e incentivo ao trabalho.

Aos colegas da pós-graduação em Periodontia, **Carol Delmondes, Livia, Umberto, Igor, Janine, Lauro, Carol Scanavez, Patrícia, Danilo, Lu Maia, Lu Bastos, Flávia, Adriana e Pri Paganini**, que nos últimos anos fizeram parte da minha vida, pelo companheirismo e amizade.

Em especial a **Carol Delmondes**, não só pela amizade, carinho e auxílio, mas, principalmente pelo sorriso e bom humor constantes.

À **Lu Maia** e a **Lu Bastos** com quem dividi tantas angustias, acertos e erros e foram fundamentais na concretização desse trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Cultura de Células, pelos bons momentos compartilhados e pelo excelente ambiente de trabalho. Agradeço especialmente ao **Roger** e ao **Lucas**, pela amizade, companheirismo, por tudo o que me ensinaram e toda a contribuição para a realização deste trabalho.

À técnica do Laboratório de Multiusuário Confocal, **Elisabete Rosa Milani**, por sua prestatividade durante a realização dos experimentos, pelos conhecimentos compartilhados, bem como, pelas lindas imagens obtidas.

À minha família, **tios e primos**, que de certa maneira, sempre estiveram de longe ou perto vibrando por minhas conquistas. Em especial a minha querida tia **Joina** por toda dedicação e prestatividade.

Às minhas grandes amigas, **Mirella e Talita**, que nem mesmo a distância e o tempo são capazes de abalar, estando sempre presentes e me incentivando.

À **Dulce de Oliveira Negretti e Tatiana Angeli Passos Fernandes**, secretárias do departamento de CTBMF e Periodontia, pela inestimável e constante ajuda, além da relação de respeito e amizade para com todos nós.

Às secretarias da seção de pós-graduação, **Isabel Sola e Regiane Cristina Sacilotto**, pela disponibilidade e atenção concedidas.

Às funcionarias da Clínica de Pós-Graduação, **Zilda e Sueli**, pela ajuda, alegria e compreensões diárias.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela estrutura científica e tecnológica oferecida aos estudantes para realização de pesquisas de excelência mundial.

À Geistlich Pharma, pelo incentivo à pesquisa e fornecimento das matrizes.

À **CAPES** pelo recurso financeiro através da bolsa de pós-graduação

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Epígrafe

“De tudo, ficaram três coisas:
a certeza de que estamos sempre começando...
a certeza de que é preciso continuar...
a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto, devemos:
fazer da interrupção, um caminho novo...
da queda, um passo de dança...
do medo, uma escada...
do sonho, uma ponte...
da procura, um encontro.”

Fernando Pessoa

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Cultura de fibroblastos. A) Fragmentos de tecido conjuntivo gengival em uma garrafa de 25 cm ² . B) Início da cultura, com fibroblastos se estendendo do explante. C) Fibroblastos em confluência. Barra = 100 µm	56
Figura 2.	Cultura em Tecido – Mucograft®: A) MCS-3D utilizada no experimento. B) Medida realizada com sonda periodontal para orientar a divisão da MCS-3D originalmente com 20 x 30 mm. C) MCS-3D sendo dividida em fragmentos com lâmina cirúrgica. D) Fragmento de MCS-3D com 10 x 10 mm. E) Fragmentos de MCS-3D. F) Preparação da placa de 6 poços. G) Lamínulas de vidro fixadas em placa de 6 poços. H) Amostras de MCS-3D aderidas a placa de 6 poços. I) Poço contendo MCS-3D + células.....	57
Figura 3.	Cultura em Tecido: Colágeno Bovino Tridimensional: A) Colágeno bovino tipo I. B) Preparação da placa de 6 poços. C) Lamínula de vidro fixada ao fundo da placa de 6 poços. D) Dispositivo de teflon de 10 x 10 x 2 mm colocado sobre lamínula de vidro. E) Arcabouço colágeno tridimensional inserido em dispositivo de teflon sobre lamínula de vidro. F) Poço contendo ColB-3D + células.....	58
Figura 4.	Cultura de Tecido - Colágeno Bovino Bidimensional: A) Colágeno bovino tipo I. B) Preparação da placa de 6 poços. C) Lamínula de vidro fixada ao fundo da placa de 6 poços. D) Solução de ColB-2D sobre lamínula de vidro. E) Remoção do excesso e ColB-2D. F) Poço contendo ColB-2D + células.....	59
Figura 5.	Epifluorescência de cultura de FGH em ColB-2D (A, D e G), ColB-3D (B, E e H) e MCS-3D (C, F e I), em 3, 7 e 10 dias. Fluorescência verde revela o citoesqueleto de actina, e azul, núcleos celulares. Nota-se em: A, D e G, FGH menos alongados, mais amplos e achatados com maior projeção de fibras de estresse, distribuídos de forma regular, com poucos espaços vazios em A e completamente preenchidos em D e G; em C, B, E, F, H e I, FGH com fenótipo fusiforme, alongado ou cilíndrico com menor quantidade de projeções, distribuídos de forma irregular formando rede celular por toda matriz interligados por junções; em F e I aspecto estrelado característico de alguns FGH cultivados sobre MCS-3D.....	66

Figura 6.	Medida da viabilidade celular de FGH em MCS-3D, ColB-2D ColB-3D determinada pelo ensaio colorimétrico MTT, expressa em absorbância em 3, 7 e 10 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a comparação intergrupos e intragrupos.....	67
Figura 7.	Curva de crescimento de FGH presentes em matriz colágena suína tridimensional (MCS-3D), colágeno bovino bidimensional (ColB-2D) e colágeno bovino tridimensional (ColB-3D), por amostra, em 3, 7 e 10 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a comparação intergrupos e intragrupos.....	68
Figura 8.	Proliferação de FGH crescidos sobre MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D, expressa em valores de % em 3, 7 e 10 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a comparação intergrupos e intragrupos.....	70
Figura 9.	Expressão de Fibronectina por FGH crescido sobre MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a comparação intergrupos e intragrupos.....	71
Figura 10.	Epifluorescência de cultura de FGH em ColB-2D (A, D e G), ColB-3D (B, E e H) e MCS-3D (C, F e I), em 3 (A-C), 7 (D-F) e 10 (G-I) dias. Fluorescência vermelha (anticorpo secundário conjugado com Alex Fluor 594) indica marcação com anticorpo anti-fibronectina e azul (marcação de DNA por DAPI), os núcleos celulares. Aos 3, 7 e 10 dias, notou-se que a marcação de fibronectina em culturas crescidas sobre ColB-2D exibia aspecto fibrilar típico, enquanto em ColB-3D e MCS-3D predominava um aspecto puntiforme e compacto. Barra para A-I = 100 μ m e para detalhes A-I = 35 μ m.....	73
Figura 11.	Expressão de Actina por FGH crescido sobre MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a comparação intergrupos e intragrupos.....	74

- Figura 12.** Epifluorescência de cultura de FGH em ColB-2D (A, D e G), ColB-3D (B, E e H) e MCS-3D (C, F e I), em 3 (A-C), 7 (D-F) e 10 (G-I) dias. Fluorescência vermelha (anticorpo secundário conjugado com Alex Fluor 594) indica marcação com anticorpo anti-actina e azul (marcação de DNA por DAPI), os núcleos celulares. Aos 3 dias, a marcação para actina era notada de forma difusa pelo citoplasma celular em células cultivadas sobre ColB-2D (detalhe em A), enquanto aquelas crescidas sobre ColB-3D e MCS-3D exibiam um padrão puntiforme (detalhe em B e C). Aos 7 e 10 dias, células cultivadas sobre ColB-2D exibiam feixes de filamentos de actina bem delimitados por todo citoplasma (detalhe em D e G), enquanto aquelas crescidas sobre as matrizes 3D demonstravam filamentos de actina arranjados de forma compacta (detalhes E-F; H-I). Barra para A-I = 100µm e para detalhes A-I = 35 µm. **75**
- Figura 13.** Expressão de Tubulina por FGH crescido sobre MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a comparação intergrupos e intragrupos..... **76**
- Figura 14.** Epifluorescência de cultura de FGH em ColB-2D (A, D e G), ColB-3D (B, E e H) e MCS-3D (C, F e I), em 3 (A-C), 7 (D-F) e 10 (G-I) dias. Fluorescência vermelha (anticorpo secundário conjugado com Alex Fluor 594) indica marcação com anticorpo anti-tubulina e azul (marcação de DNA por DAPI), os núcleos celulares. As células cultivadas sobre as três superfícies exibiam expressão da proteína citoesquelética tubulina. Aos 3, 7 e 10 dias, a marcação para tubulina em células crescidas sobre ColB-2D, ColB-3D e MCS-3D era caracterizada por arranjos filamentosos que se projetavam da região nuclear e se extendiam pelo citoplasma celular. Contudo, aos 7 dias, um número significativo de células cultivadas sobre ColB-3D exibiam marcação predominantemente na região perinuclear (detalhe em H). Barra para A-I = 100µm e para detalhes A-I = 35 µm..... **77**

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Média do número total de FGH presentes na MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D, por amostra, em 3, 7 e 10 dias.....	69
Tabela 2.	Média da expressão de proteínas da matriz extracelular não colágena - fibronectina (FIBRO) e das proteínas do citoesqueleto - tubulina (TUB) e actina (ACT) por FGH na MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D em 3, 7 e 10 dias.....	72

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: grau Celsius

2D: bidimensional

3D: tridimensional

ColB-2D: Colágeno bovino bidimensional

ColB-3D: Colágeno bovino tridimensional

Cm: centímetro

d: dias

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride

DMEM: Meio de Dulbecco modificado por Eagle

ETC: Enxerto de tecido conjuntivo

EGL: Enxerto gengival livre

ETCSE: Enxerto de tecido conjuntivo subepitelial

FGH: fibroblasto gengival humano

h: hora

IGF: Fator de crescimento semelhante a insulina

JCE: Junção cimento esmalte

KGF: Fator de crescimento de queratinócitos

MCS-3D: Matriz colágena suína tridimensional

MDA: Matriz dérmica acelular

MEC: Matriz extracelular

MECN: Matriz extracelular natural

mg/ mL: Miligrama por mililitro

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mM: Milimolar

MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

ng/mL: Nanograma por mililitro

nm: Nanômetro

PDGF-A: Fator de crescimento derivado das plaquetas

PB: Solução de fosfato tamponado

ROG: Regeneração óssea guiada

RPM: Rotações por minuto

RTG: Regeneração tecidual guiada

SFB: Soro fetal bovino

TA: Temperatura ambiente

TGF- β 1: Fator de crescimento beta transformador

μ g/ mL: Micrograma por mililitro

μ l: Microlitro

μ m: Micrômetro

VEGF: Fator de crescimento vascular

Resumo

RESUMO

Mandetta CMR. **Avaliação *in vitro* de matriz colágena suína como arcabouço tridimensional para cultivo de fibroblastos gengivais.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2012.

Introdução: Fibroblastos gengivais desempenham um importante papel na regeneração de tecidos moles de proteção. Mucograft® (MCS-3D) é um substituto xenógeno novo que vem sendo utilizado na periodontia em técnicas de recobrimento radicular e aumento de tecido queratinizado. O objetivo do presente estudo foi avaliar morfológica, bioquímica e imunohistoquimicamente, se a MCS-3D é uma matriz tridimensional adequada para o crescimento, *in vitro*, de fibroblastos gengivais humanos (FGH). **Material e Métodos:** FGH foram obtidos pela técnica do explante a partir de tecido conjuntivo gengival de três indivíduos. Os FGH foram cultivados sobre colágeno bovino bidimensional (ColB-2D), colágeno bovino tridimensional (ColB-3D) e matriz colágena suína tridimensional (MCS-3D) por até 10 dias. Em 3, 7 e 10 dias, os seguintes parâmetros foram avaliados: número, morfologia e distribuição de FGH por fluorescência direta; viabilidade celular por MTT; proliferação celular e expressão de proteínas citoesqueléticas: actina e tubulina e proteínas da matriz extracelular não colágena: fibronectina imunofluorescência indireta. Os dados quantitativos foram submetidos aos testes estatísticos de Friedman para comparação intra e intergrupos para as variáveis da análise de expressão das proteínas: fibronectina, actina e tubulina. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparações intra e intergrupos, seguido do teste de Tukey para as variáveis das análises de viabilidade, proliferação e número total de células. **Resultados:** A epifluorescência revelou que em 3 dias os FGH apresentavam-se aderidos em todos os grupos experimentais. FGH cultivados sobre ColB-2D exibiram forma menos alongada, ampla e achatada com maior quantidade de projeções e numerosas fibras de estresse em 3, 7 e 10 dias. Por outro lado, os FGH cultivados sobre ColB-3D e MCS-3D demonstraram, em todos os períodos experimentais, fenótipo fusiforme, alongado ou cilíndrico com menor quantidade de projeções do que observado no substrato 2D, com algumas das células cultivadas sobre MCS-3D

demonstrando aspecto estrelado. O ensaio de MTT revelou viabilidade celular significativamente superior no ColB-2D e MCS-3D do que no ColB-3D ($p < 0,001$), em todos os períodos experimentais. Em 3 dias, foi observado maior número de FGH cultivados sobre ColB-2D seguido por MCS-3D e ColB-3D respectivamente, havendo diferença estatística entre ColB-2D e MCS-3D ($p < 0,001$) e entre ColB-2D e ColB-3D ($p < 0,001$). No sétimo dia houve redução no número de células no ColB-2D e aumento na MCS-3D e ColB-3D, em que o número de células foi significativamente superior no ColB-2D com relação a MCS-3D ($p = 0,002$). Ao final do período experimental, foi observado aumento no número de células em todos os grupos experimentais, sendo o número de células, mais uma vez, significativamente superior no ColB-2D do que na MCS-3D ($p = 0,002$). Maior porcentagem de FGH no ciclo celular pode ser observado em ColB-2D seguido por ColB-3D e MCS-3D, respectivamente, em todos os períodos experimentais. Na MCS-3D praticamente não houve marcação por Ki-67 e o ColB-2D apresentou redução significativa de FGH ciclando entre o período de 3 e 10 dias ($p = 0,036$). A expressão de proteínas não colágenas e citoesqueléticas foi similar em todas as matrizes experimentais durante o estudo. **Conclusão:** Podemos concluir que a MCS-3D constitui uma matriz adequada para o cultivo de fibroblastos gengivais humanos, uma vez que, no interior da matriz, importantes propriedades foram verificadas, dentre as quais, morfologia, proliferação, e expressão de proteínas, semelhantes a uma matriz colágena tridimensional já consagrada na literatura.

Palavras-chave: Matriz colágena suína, Fibroblastos gengivais, Cultura tridimensional, Engenharia de tecidos.

Abstract

ABSTRACT

Mandetta CMR. **In vitro evaluation of porcine collagen matrix as a three-dimensional scaffold for gingival fibroblasts seeding.** Thesis (Master) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2012.

Introduction: Gingival fibroblasts play a central role in oral soft tissue regeneration. Mucograft® (PCM-3D) is a new xenogeneic substitute that has been used in periodontics in techniques such as root coverage and increasing keratinized tissue. The aim of this investigation was to verify if PCM-3D is a suitable three-dimensional matrix through its *in vitro* response to the culture of human gingival fibroblasts (HGF). **Methods:** HGF culture was established by the explant technique of gingival connective tissues of three healthy patients. HGF were seeded on bidimensional bovine collagen matrix (BCol-2D), three-dimensional bovine collagen matrix (BCol-3D) and three-dimensional porcine collagen matrix (PCM-3D). HGF were grown for up to 10 days. At 3, 7 and 10 days the following parameters were assessed: HGF number, morphology and distribution by direct fluorescence; cell viability by MTT; cell proliferation and expression of proteins of the extracellular matrix non-collagenous – fibronectin and cytoskeletal proteins – actin and tubulin by indirect immunofluorescence. Quantitative data were submitted to Friedman and Kruskal-Wallis test, and the last one was followed by Tukey's test. **Results:** Epifluorescence revealed that at 3 days HGF grown on BCol-2D were broader, more flattened and had more cell protrusions and stress fibers in all experimental times. On the other hand, HGF seeded on BCol-3D and PCM-3D displayed a spindle-shaped, elongated, or cylindrical phenotype with fewer protrusions as well as less total cell spread area than on the 2D matrix, with some cells on PCM-3D showing stellate appearance. MTT assay showed cell viability higher in cultures grown on BCol-2D and PCM-3D than in BCol-3D ($p < 0,001$). At 3 days a greater number of cells in BCol-2D samples followed by PCM-3D and BCol-3D, respectively, was observed with statistical difference between BCol-2D and PCM-3D and between BCol-2D e PCM-3D ($p < 0,001$). At 7 days, there was a decrease in cell number grown on BCol-2D and an increase in BCol-3D and PCM-3D, where the number of cells were significantly

higher in BCol-2D in relation to PCM-3D ($p=0.002$). At the end of the experimental period, there was an increase in total cell number in all of the experimental groups, and it was again significantly greater in BCol-2D than in PCM ($p=0.005$). Between 3 and 10 days, there was an increase in total cell number in ColB-3D ($p<0.001$), which showed higher counts within 10 days. Higher percentage of HGF in the cell cycle could be seen in BCol-2D followed by BCol-3D and PCM-3D, in all of the experimental groups. In PCM-3D there was almost no expression of Ki-67. BCol-2D showed a decrease in HGF cycling between 3 and 10 days ($p=0,036$). The expression of non-collagenous and cytoskeletal proteins were similar all matrices during the period of the study. **Conclusion:** PCM-3D is a suitable matrix for HGF cultivation, since important properties were found inside the matrix, such as morphology, proliferation and expression of proteins similar to those seen in a three-dimensional collagen matrix well established in the literature.

Key-words: Porcine collagen matrix, Gingival fibroblasts, Three-dimensional culture Tissue engineering.

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	30
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	34
2.1. Bioengenharia Tecidual.....	35
2.2. Cultura Tridimensional.....	37
2.3. Colágeno.....	40
2.4. Fibroblastos Gengivais Humanos.....	43
2.5. Mucograft®.....	45
3. PROPOSIÇÃO.....	52
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
4.1. Cultura de Células.....	55
4.2. Cultura de Tecido.....	56
4.2.1. Mucograft®.....	56
4.2.2. Colágeno Bovino Tridimensional.....	57
4.2.3. Colágeno Bovino Bidimensional.....	58
4.3. Morfologia e Distribuição Celular na MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D.....	59
4.4. Localização de proteínas da matriz extracelular não colágena e de proteínas do citoesqueleto.....	60
4.5. Proliferação Celular por imunolocalização do antígeno nuclear Ki-67.....	61
4.6. Viabilidade celular.....	62
4.7. Análise estatística.....	63
5. RESULTADOS.....	64
5.1. Morfologia e distribuição de células na MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D.....	65
5.2. Viabilidade celular.....	67
5.3. Número total de células.....	68
5.4. Proliferação celular.....	69
5.5. Expressão de proteínas da matriz extracelular não colágena – fibronectina (FIBRO) e das proteínas do citoesqueleto – tubulina (TUB) e actina (ACT).....	70
5.5.1. Expressão de Fibronectina.....	70
5.5.2 Expressão de Actina.....	74

5.5.3. <i>Expressão de Tubulina</i>	76
6. DISCUSSÃO	78
7. CONCLUSÃO	86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
APÊNDICE	107
ANEXO	127

INTRODUÇÃO

---

1. INTRODUÇÃO

A manipulação dos tecidos moles orais tornou-se um dos principais desafios entre as cirurgias crânio-maxilo-faciais. Em décadas recentes, o objetivo principal das cirurgias mucogengivais sofreu modificações, passando, sobretudo, da simples busca pela restauração ou manutenção da saúde gengival para a resolução concomitante da demanda estética do paciente^{1,2}. A fim de melhorar os resultados funcionais e estéticos, além da previsibilidade e estabilidade dos casos que envolvem a reconstrução de tecidos gengivais perdidos, enxertos autógenos, entre os quais o enxerto gengival livre e o enxerto de tecido conjuntivo subepitelial, ainda são considerados como padrão ouro, devido aos excelentes resultados estéticos alcançados e à alta previsibilidade da técnica³. Estes procedimentos exigem, no entanto, um segundo sítio cirúrgico, na maioria das vezes realizado no palato, para a remoção do tecido a ser enxertado e, por isso, são associados com efeitos adversos indesejados, como dor e desconforto pós-cirúrgicos, além do risco de sangramento aumentado na área doadora^{4,5}, e da possibilidade de não haver tecido suficiente para a realização de determinados procedimentos^{6,7}.

A fim de evitar a morbidade associada ao paciente e sobrepor as demais desvantagens dos enxertos autógenos de tecido mole, enxertos de matriz dérmica acelular humana - MDA têm sido utilizados como substitutos ao tecido removido do palato para aumentar a faixa de gengiva queratinizada ao redor de dentes e implantes⁸⁻¹⁰, para o tratamento de deformidades de rebordo alveolar¹¹ e procedimentos de recobrimento radicular¹²⁻¹⁴. Entretanto, devido a esse aloenxerto ser derivado de cadáveres humanos, associa-se o seu uso a preocupações éticas e com o possível risco de transmissão de doenças. Uma opção alternativa, evitando tanto a necessidade de remoção de tecido autógeno como o emprego de enxertos alógenos, é o uso de membranas de colágeno de origem suína, que já são consideradas padrão em procedimentos de cicatrização de feridas orais em associação com aumento ósseo^{15,16}. Recentemente, uma nova matriz colágena de origem suína (MCS-3D) foi desenvolvida, tendo sua eficácia avaliada tanto no estabelecimento de nova faixa de tecido queratinizado¹⁷⁻¹⁹ como para o recobrimento radicular de retrações gengivais classe I e II de Miller²⁰⁻²⁴ com resultados promissores.

No entanto, a MCS-3D exibe diferenças estruturais significantes em relação aos enxertos autógenos. O processo de cicatrização e revascularização de um enxerto autógeno baseia-se na anastomose entre os vasos sanguíneos do leito receptor e aqueles pré-existentes no enxerto²⁵. Devido a sua estrutura não vital, a MCS depende apenas de células e vasos sanguíneos do hospedeiro para alcançar a reorganização, o que leva a uma incorporação mais lenta¹⁹ e contração^{26,27}. A incorporação mais lenta aos tecidos do hospedeiro pode resultar em deficiências estruturais e funcionais já que as interações célula-célula e a manutenção de vasos sanguíneos apresentam uma importante influência na maturação dos enxertos²⁸.

A engenharia tecidual e a medicina regenerativa fazem parte de um campo multidisciplinar e interdisciplinar, no qual os princípios de biologia, química e engenharia são aplicados em razão da geração de substitutos biológicos que buscam preservar, restaurar ou criar um tecido funcional²⁹⁻³¹. Dessa forma, na engenharia tecidual periodontal busca-se especificamente restaurar a estrutura e a função do osso alveolar, cemento associado ao dente, ligamento periodontal e tecidos moles de proteção³¹⁻³². Com essa finalidade, três abordagens têm sido adotadas para a criação de novos tecidos: isolamento de células, arcabouços biocompatíveis e moléculas sinalizadoras³⁰. A tecnologia da engenharia tecidual através do transplante de células autógenas é um dos conceitos terapêuticos em desenvolvimento mais promissores, por permitir a resolução de uma série de problemas, incluindo a morbidade da área doadora nos casos de enxertos autógenos, imunogenicidade de enxertos alogênicos e perda de implantes aloplásticos³³. Um dos objetivos principais da pesquisa na área da periodontia é a busca por materiais biocompatíveis, que possam ser aplicados como matrizes, capazes de substituir os tecidos gengivais perdidos, que são integrados e gradualmente substituídos ou incorporados pelos tecidos do hospedeiro. Estes materiais ajudariam na obtenção de contornos gengivais harmoniosos para melhoria da condição estética e da saúde periodontal³⁴.

Diferentes biomateriais vêm sendo estudados para serem empregados como arcabouços. Estes incluem polímeros sintéticos, como os ácidos polilático e poliglicólico, e polímeros naturais, como os alginatos³⁵, colágeno^{36,37} e fibrina^{38,39}. Um dos materiais mais interessantes é o colágeno, pois compreende o principal componente da (MECN), promove interações celulares naturais tais como a

migração e a proliferação, é biocompatível e pode ser remodelado *in vivo*. Além da baixa imunogenicidade, o uso do colágeno é perpetuado pela posse das menores influências bioativas conhecidas, não observadas com o uso de materiais sintéticos que podem influenciar a adesão, morfologia e espreado celular³⁵.

Diversos tipos celulares têm sido utilizados para cultivo e correção de defeitos orais. As culturas de fibroblastos humanos representam um modelo válido para estudar os processos moleculares que organizam o tecido conjuntivo, uma vez que *in vitro* estas células exibem morfologia e distribuição espacial similar ao sistema *in vivo*. Os fibroblastos são células de forma irregular que exercem importante papel na cicatrização e reparo tecidual através da regulação da deposição da matriz^{40,41} e síntese de uma variedade de fatores de crescimento⁴².

Culturas de fibroblastos em diferentes tipos de matrizes têm sido investigadas como alternativa para alcançar a cicatrização precoce, melhorar a incorporação e diminuir a contração dos enxertos em procedimentos de reconstrução de tecidos moles ou aumento tecidual^{34,43-45}. Entretanto para alcançar sucesso com essa terapia é importante encontrar um arcabouço ideal, capaz de manter a arquitetura para a formação dos novos tecidos, manter as distâncias entre as células do parênquima para permitir a difusão de gases e nutrientes e, possivelmente a invasão dos vasos sanguíneos provenientes dos tecidos hospedeiros adjacentes^{46,47}. Ainda mais importante que essas características, um material ideal para a engenharia tecidual deve apresentar densidade de colágeno e resistência adequados para permitir distribuição homogênea das células através do arcabouço^{48,49}.

A pesquisa de novas alternativas que possam melhorar a incorporação de enxertos xenógenos e reduzir o tempo de cicatrização desses materiais na reconstrução de tecidos moles ou aumento de tecidos orais ainda é limitada. A possibilidade de cultivo de células autógenas na MCS-3D previamente à sua utilização deve ser considerada. No entanto, são necessários estudos *in vitro* para avaliar o tempo e a complexidade desse procedimento e, sobretudo, o desenvolvimento celular nesse biomaterial. Futuros estudos em modelo animal, envolvendo a cultura de células, e em especial fibroblastos gengivais em um arcabouço 3D, permitirão avaliar a aplicabilidade do método.

REVISÃO DA LITERATURA

---

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Bioengenharia Tecidual

A engenharia tecidual faz parte de um campo multidisciplinar e interdisciplinar emergente que aplica os princípios da engenharia e biologia para o desenvolvimento de substitutos biológicos. Apresenta potencial para revolucionar a maneira como a saúde e a qualidade de vida serão melhoradas para milhares de pessoas através da restauração, manutenção ou preservação das funções de tecidos e órgãos^{31,50}. Aplicada à biologia periodontal, a engenharia tecidual exhibe potencial para melhorar a regeneração das complexas estruturas de suporte dentárias perdidas, de maneira mais previsível do que os tratamentos periodontais convencionais⁵¹. A engenharia periodontal utiliza tecnologias avançadas de engenharia e biologia para restaurar a estrutura e função do osso alveolar, ligamento periodontal, cimento e tecidos gengivais recriando a complexa interface periodontal caracterizada pela integração de vários tecidos e orientação adequada dos mesmos⁵².

A engenharia tecidual depende de três elementos fundamentais: células, moléculas sinalizadoras adequadas e arcabouços. As células fornecem o maquinário para o crescimento e diferenciação do novo tecido, enquanto os fatores de crescimento e outras moléculas modulam a atividade celular e fornecem estímulos para que as células se diferenciem e suportem a formação tecidual. Uma estrutura tridimensional, formada por um biomaterial que atua como matriz extracelular (MEC) sintética, ou seja, um arcabouço é fornecido para suportar e facilitar este processo que é crítico para a regeneração tecidual^{31,53,54}. Três caminhos têm sido explorados na criação de novos tecidos com base na estratégia da engenharia tecidual para a regeneração periodontal: a injeção de células isoladas, o desenvolvimento de sistemas encapsulados de transporte e o transplante de células em matrizes^{55,56}. A técnica baseia-se na observação biológica de que células dissociadas irão se reorganizar *in vitro* em estruturas que se assemelham ao tecido original quando fornecido um ambiente adequado⁴⁶.

Procedimentos de engenharia que se baseiam no transplante de células em matrizes empregam MEC exógenas desenvolvidas para colocar os diferentes tipos

celulares em contato, em um ambiente tridimensional (3D) adequado. Este irá funcionar como um arcabouço para guiar as células para locais específicos do organismo, manter a arquitetura para a formação de novos tecidos, fornecer suporte mecânico temporário suficiente para suportar forças *in vivo* até que o tecido formado tenha integridade mecânica suficiente para se sustentar. Ainda, deverá manter a distância entre as células do parênquima que permite a difusão de gases e nutrientes e, possivelmente, o crescimento vascular proveniente do hospedeiro⁴⁷. Essa interação matriz-célula fornecerá sinais específicos para orientar a expressão gênica de células que formam o tecido entrem em equilíbrio^{43,46,48}. Com isso, a engenharia tecidual pode contornar as principais limitações das terapias convencionais, que incluem uma oferta limitada de tecidos doadores e limitada função de materiais substitutos⁴⁶.

A fonte das células para cultivo *in vitro* é de grande importância para o desenvolvimento de substitutos orais para enxerto. Uma terapia baseada em células para a regeneração de tecidos orais deve utilizar células autógenas, pelo fato do sistema imunológico do organismo hospedeiro poder destruir enxertos heterógenos ou xenógenos. Além disso, as células devem ser de fácil obtenção, com mínima morbidade na área doadora. Os arcabouços devem conter células capazes de produzir um tecido funcional *in vivo*, quer de forma autônoma ou através da modificação genética ou em resposta a estímulos exógenos indutivos⁴⁸.

As células isoladas a partir de amostras ou biopsias de tecidos são expandidas *in vitro* e colocadas em matrizes sintéticas 3D as quais permitem a interação célula-célula e célula-matriz⁵⁷. Esta interação deve ser devidamente regulada durante o processo de desenvolvimento dos tecidos, a fim de induzir o padrão requerido de expressão gênica. A expressão de genes por células em tecidos artificiais pode ser regulada por múltiplas interações com o microambiente, incluindo interações com a superfície de aderência, com outras células, com fatores de crescimento solúveis, e estímulos mecânicos sobre as células⁴⁶.

Os biomateriais desempenham papel central em estratégias de engenharia tecidual como ambientes biofísicos e bioquímicos tridimensionais, que mimetizam as características regulatórias da MECN, direcionando o complexo processo espacial e temporal multicelular, além da função celular, culminando na formação e regeneração tecidual⁵⁸⁻⁶⁰. Nesse contexto, diversos biomateriais têm sido

desenvolvidos a fim de mimetizar as características únicas da MECN. Em geral, estes biomateriais podem ser divididos em 4 grupos: metais, cerâmicas, polímeros e compósitos⁶¹. Entre eles, os materiais poliméricos, que podem ser de origem natural ou sintética, recebem atenção substancial devido à grande flexibilidade na concepção da composição e estrutura para necessidades específicas⁶².

2.2. Cultura Tridimensional

Está bem estabelecido que nos organismos vivos as células residem, diferenciam-se e proliferam-se em um complexo ambiente tridimensional – MECN. A MECN é normalmente composta por componentes sintetizados e depositados pela superfície externa das células, que fornecem integridade funcional e estrutural ao tecido conjuntivo e órgãos. A síntese e deposição de MEC ocorrem amplamente em resposta a fatores de crescimento, citocinas e sinais mecânicos mediados por receptores de superfície celular, denominados integrinas, que mediam esta comunicação entre a MEC e as células. Estes receptores proporcionam pontos de fixação que as células podem utilizar para detectar perturbações mecânicas e para remodelar a matriz depositada a fim de torná-la estruturalmente e funcionalmente viável⁵⁶.

A adesão célula-matriz media as respostas fisiológicas que regulam o crescimento, migração, diferenciação e sobrevivência celular além da organização tecidual e remodelação da matriz⁶³. Os tipos de adesão célula-matriz mediadas por integrinas *in vitro*, e os sinais de transdução são fortemente afetados pelas superfícies planas e rígidas das placas de cultura que caracterizam a cultura bidimensional (2D), portanto, uma maior aproximação ao ambiente *in vivo* pode ser atingida pela cultura de células em géis ou matrizes 3D⁶⁴. Assim, arcabouços funcionais que permitem o crescimento celular enquanto promovem organização e função tecidual devem tentar igualar-se à MECN em múltipla escala⁶⁵.

Ao longo dos últimos anos, inúmeros estudos *in vitro* têm investigado os mecanismos moleculares que conduzem à remodelação da MEC. Tem sido demonstrado que as propriedades das células e de sua MEC em cultura 2D diferem

substancialmente daquelas em ambiente tridimensional⁶⁶⁻⁶⁸. Tais estudos inspiraram a recente transição de técnicas de cultura 2D para 3D objetivando recapitular a biologia *in vivo* e têm criado significativo impacto no conhecimento da arquitetura da MEC e seu papel na remodelação^{69,70}.

Nesse sentido, os arcabouços tridimensionais foram introduzidos com o objetivo de superar as limitações do cultivo de células sobre a estrutura rígida e plástica das culturas bidimensionais. Essas matrizes ou arcabouços são substratos porosos capazes de suportar o crescimento, organização e diferenciação celular em sua estrutura, com as quais as células interagiriam *in vivo*⁶². De acordo com Tibbitt & Anseth⁷¹ para o correto estudo da fisiologia, mecanotransdução celular e morfogênese tecidual *in vitro*, células devem ser cultivadas em modelos 3D, que recapitulam o crítico desempenho mecânico e bioquímico presentes na MECN, facilitando os processos hierárquicos como a migração e a organização tecidual. Os arcabouços são projetados para serem implantados em pacientes como um suporte temporário para restaurar ou manter a função de tecidos originais ou para serem usados em sistemas de modelo *in vitro* que facilitam a análise da biologia celular e molecular melhorando o entendimento biológico⁷².

Segundo Lee e colaboradores⁶², um material ideal para ser utilizado como matriz 3D no desenvolvimento de novos tecidos deve ser biocompatível, facilitar o transporte de células para locais específicos do organismo, fornecer integridade estrutural temporária suficiente até que o tecido neoformado apresente integridade mecânica adequada para suporte próprio. Para substituir completamente um tecido perdido ou deficiente, esse material deve ser totalmente integrado aos tecidos do hospedeiro em termos de suprimento vascular. Para tanto, é necessário que a matriz seja passível de invasão de vasos sanguíneos que facilitariam o transporte metabólico do leito receptor, o que pode ser controlado através da porosidade do material, que permite ainda a difusão de gases e nutrientes. Outra função importante de uma matriz é guiar a reestruturação que ocorre através da proliferação das células transplantadas e da penetração de tecidos do leito receptor^{46,47}. Esta matriz deve ainda apresentar velocidade de degradação compatível com aquela do crescimento do tecido para o qual serve como suporte⁷³, e permitir a associação com fatores de crescimento celular específicos para indução de respostas celulares mais rápidas e específicas⁷⁴, além apresentar características ambientais que

induzam a expressão gênica requerida para a reconstrução tecidual, já que funções e fenótipos celulares são regulados pelo microambiente de residência das células em questão^{57,75}.

O cultivo de células em matrizes 3D não é uma ideia nova. Cerca de 50 anos atrás, Paul Weiss⁷⁶, mostrou que fibroblastos cultivados em um coágulo de plasma sanguíneo variaram em morfologia, de estrelados a bipolares, dependendo da orientação da rede fibrosa do coágulo, e utilizou essa informação para enfatizar a dinâmica interação entre as células e seu ambiente físico. Em 1972, Elsdale & Bard⁷⁷ descreveram um modelo de sistema para fibroblastos no corpo usando matrizes polimerizadas de colágeno tipo I, *in vitro*, para formar uma rede fibrosa 3D. Estes géis de colágeno 3D induziram mudanças morfológicas nos fibroblastos que parcialmente mimetizaram células do tecido conjuntivo *in vivo*.

Desde então, tem se observado que o sistema de cultura de células 3D constitui um modelo útil para analisar as características funcionais e bioquímicas das interações recíprocas e adaptativas entre as células e a matriz circunjacente em um ambiente semelhante àquele encontrado *in vivo*^{78,79}. Nas matrizes 3D, o resultado da migração celular inclui não apenas translocação das células, mas também a remodelação da matriz⁸⁰. Sinais mecânicos da matriz remodelada que voltam para modular o fenótipo da célula em um processo interativo apresentam particular importância na morfogênese do tecido conjuntivo. A mecânica do tecido não depende somente das características individuais de células e moléculas da matriz, mas também das complexas interações organizacionais e recíprocas que ocorrem entre os grupos de células e a matriz que as circunda^{81,82}. Dessa forma, as propriedades do arcabouço, como a rigidez e nanoestrutura, também apresentam importante papel na resposta celular. Estudos recentes têm demonstrado que a rigidez de substratos 2D e 3D afetam a diferenciação, morfologia, espraiamento de vários tipos celulares⁸³⁻⁸⁵ e expressão de proteínas⁸⁶⁻⁹¹.

Uma série de trabalhos vem sendo realizados com a finalidade de avaliar o ingresso de fibroblastos em matrizes 3D. Hillman *et al.*⁴⁸ mostraram em estudo comparativo entre matrizes que nos arcabouços de colágeno com densas redes de fibrilas a migração celular foi menor para o interior da matriz, não estabelecendo adequada organização em rede 3D para o cultivo de FGH. As fibras de colágeno apresentavam arranjo muito denso para permitir distribuição homogênea de células

e estabelecimento de uma rede semelhante aos tecidos. Por outro lado, o arcabouço sintético testado (ácido poliglicólico associado ao ácido poli lático) facilitou a distribuição homogênea das células entre as fibras do arcabouço e a orientação das células comparavelmente ao que ocorre nas situações *in vivo*. Ojeh et al.⁹² observaram a presença de fibroblastos até aproximadamente a metade da profundidade de um equivalente dérmico. Moscato et al.⁹³ mostrou fibroblastos distribuídos sobre a superfície e através de uma matriz preparada por uma mistura de poli (álcool vinílico) e gelatina, produzindo quantidades similares de fibronectina e outras proteínas tanto na matriz 3D como na 2D.

Mais recentemente, outros trabalhos *in vitro* foram realizados a fim de avaliar eficácia da MDA como matriz 3D, com isso demonstraram formação de monocamada de células na superfície da MDA com maior porcentagem celular na superfície da matriz do que em seu interior. Concluindo assim que a MDA não é adequada como matriz 3D para o crescimento de fibroblastos gengivais, uma vez que estes só puderam ser localizados na porção superficial da matriz^{94,95}.

2.3. Colágeno

Dentre os materiais poliméricos, os de origem natural, especialmente o colágeno, recebe bastante evidência por ser biocompatível, estar envolvido em inúmeros processos fisiológicos⁹⁶, além de suas propriedades mecânicas, biológicas e químicas serem muito semelhantes às do tecido humano⁹⁷.

O colágeno é o material estrutural primário dos vertebrados e é a proteína mais abundante do organismo vivo, representando cerca de 20-30% das proteínas totais do corpo. Apresenta importância fundamental na constituição da MEC do tecido conjuntivo, sendo responsável por grande parte de suas propriedades físicas⁹⁸. O colágeno tipo I é o principal constituinte do tecido conjuntivo, constituindo mais de 90% do total de colágeno presente nos mamíferos⁹⁹, portanto, apresenta importante papel na biologia celular e nas aplicações biomédicas. Muitos estudos sobre comportamento celular em matrizes colágenas mostram que o colágeno influencia a morfologia, migração, adesão e diferenciação celular³⁵ sendo degradado

pelas metaloproteinases, especificamente as collagenases. Além disso, substratos de colágeno são capazes de alterar o perfil de progressão do fenótipo celular¹⁰⁰.

Nesse contexto tem-se utilizado MEC formadas por colágeno e elastina, obtidas de matrizes homólogas ou heterólogas, dos quais células e outros componentes responsáveis por respostas biológicas não desejáveis tenham sido convenientemente removidas^{101,102}. Em geral, materiais derivados de fontes naturais, como os componentes de proteínas purificadas como o colágeno de tecidos animais, são vantajosos devido as suas propriedades inerentes de reconhecimento biológico, incluindo a apresentação de ligantes aos receptores e susceptibilidade de desencadeamento de degradação proteolítica e remodelação⁷².

Os géis de colágeno são capazes de tomar qualquer forma desejada e, portanto, adaptar-se a qualquer tamanho e formato de defeito. Inversamente a outros tipos de biomateriais, em que geralmente as células só podem ser semeadas sobre a superfície do arcabouço, os géis de colágeno mostram uma distribuição celular uniforme, o que permite a síntese homogênea de componentes da matriz extracelular¹⁰³. O problema principal dos géis de colágeno é a contração, que é dependente da densidade e proliferação celular dentro do gel, concentração de colágeno, fatores de crescimento, bem como o número e comprimento das fibras¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Quando os fibroblastos interagem com matrizes colágenas, ao contrário das superfícies planas, as células podem penetrar as substâncias da matriz e envolver-se em suas fibrilas^{107,108}, e as adesões celulares ficam limitadas às fibrilas da matriz ao invés de campos contínuos da matriz adsorvida¹⁰⁸. Células interagindo com estas matrizes exibem padrões distintos de sinalização e migração^{64,109} além de remodelar as fibrilas da matriz em estruturas reorganizadas tanto local quanto globalmente^{78,110}. Enquanto as células, sobre superfícies planas, podem modular sua função citoesquelética em resposta à superfície mecânica¹¹¹, apresentam pequena capacidade de modular a organização molecular global e propriedades mecânicas da MEC plana revestida.

Durante a cultura de fibroblastos em matriz de colágeno, alterações na propriedade da matriz, causadas pela atividade migratória das células estão associadas tanto a parâmetros locais quanto globais⁷⁸. Ao nível local, a remodelação causa um aumento proximal na densidade das fibrilas imediatamente ao redor dos fibroblastos, muitas vezes atingindo a concentração de proteína encontrada nos

tecidos maduros, por sua vez, este aumento da densidade leva ao aumento na rigidez da matriz¹¹². Ao nível global, o aumento na densidade da matriz resulta em uma diminuição correspondente em seu volume, frequentemente mencionado como contração. O arranjo da matriz durante a remodelação – se é restrito (fixo a superfície onde esta sendo feita a cultura) ou livre (flutuando no meio de cultura) determina a organização das fibrilas de colágeno da matriz em resposta a remodelação. Isto é, se a matriz é contida, então, em resposta à força exercida pelas células, as fibrilas de colágeno tornam-se orientadas no mesmo plano que o sistema de retenção subjacente. Sob esta condição, ocorre o desenvolvimento de carga mecânica (tensão) no interior da matriz. Inversamente, se a matriz é flutuante, as fibrilas de colágeno oferecem pouca resistência à força celular, e a remodelação ocorre sem que as fibrilas colágenas desenvolvam uma orientação particular. Como resultado, a matriz não desenvolve tensão, isto é, permanece mecanicamente descarregada¹¹³.

Estas mudanças mecânicas têm profundas consequências fenotípicas. Por exemplo, o carregamento mecânico conduz a um fenótipo celular sintético caracterizado por aumento da síntese e diminuição da degradação da matriz^{114,115}. Já os fibroblastos em matrizes flutuantes tornam-se quiescentes e as alterações nas integrinas levam ao aparecimento de apoptose em uma subpopulação de células¹¹⁶.

Dessa forma, as interações dos fibroblastos com as matrizes de colágeno são determinadas pelo menos em parte pelo estado de tensão célula-matriz. Fibroblastos em matrizes de colágeno, em estado de baixa tensão célula-matriz, apresentam morfologia dendrítica. Eles formam uma rede celular por toda a matriz separados por meio de lacunas e interligados por junções. Fibroblastos dendríticos são quiescentes e exibem baixa atividade de biossíntese na matriz. Já os fibroblastos em estado de alta tensão célula-matriz tem aparência lamelar e lembram células em culturas interagindo com superfícies planas revestidas por colágeno. Fibroblastos lamelares são proliferativos e exibem alta atividade de biossíntese na matriz. Estas células correspondem aos fibroblastos, presentes em feridas, responsáveis pela biossíntese de tecido conjuntivo e contração durante a cicatrização. Os fibroblastos em estado de alta e baixa tensão célula-matriz regulam suas morfologias através de diferentes mecanismos citoesqueléticos. Células em estado de baixa tensão requerem microtúbulos para a formação das extensões

dendríticas, além de participarem no espraçamento celular enquanto que as células em alto estado de tensão requerem os microtúbulos para sua polarização e não para o espraçamento celular^{117,118}.

2.4. Fibroblastos Gengivais Humanos

A fonte das células para cultivo *in vitro* é de grande importância para o desenvolvimento de substitutos orais para enxerto. Uma terapia baseada em células para a regeneração de tecidos orais deve utilizar células autógenas, pelo fato do sistema imunológico do organismo hospedeiro poder destruir enxertos heterógenos ou xenógenos. Além disso, as células devem ser de fácil obtenção, com mínima morbidade na área doadora. Os arcabouços devem conter células capazes de produzir um tecido funcional *in vivo*, quer de forma autônoma ou através da modificação genética ou em resposta a estímulos exógenos indutivos⁴⁸.

Nesse sentido, diversos tipos celulares têm sido utilizados para cultivo e correção de defeitos orais. As culturas de fibroblastos humanos representam um modelo válido para estudar os processos moleculares que organizam o tecido conjuntivo, uma vez que *in vitro* estas células exibem morfologia e distribuição espacial similar ao sistema *in vivo*. Os fibroblastos gengivais desempenham papel importante na regeneração dos tecidos, uma vez que chegam ao local da injúria em estágios bastante precoces e proliferam-se rapidamente de acordo com a progressão da cicatrização dos tecidos¹¹⁹. Assim, aceleram o processo de cicatrização através da regulação da deposição de matriz (colágeno tipo I e IV, elastina e laminina)^{40,41}, síntese de uma variedade de fatores de crescimento, entre os quais se destacam o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de crescimento vascular (VEGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF-A) e fator de crescimento beta transformador (TGF- β 1) e citocinas envolvidas no processo de cicatrização, além de estimular a diferenciação de células epiteliais²⁸. Uma vez presentes no equivalente dérmico, os fibroblastos não estimulam apenas a produção de queratinócitos e sua diferenciação, mas também a regeneração da membrana basal, acelerando e

umentando a qualidade dos tecidos regenerados⁴¹.

Na dermatologia, culturas de fibroblastos/queratinócitos foram associadas a MDA e outros tipos de arcabouços com o intuito de desenvolver substitutos de pele para o tratamento de feridas, em estudos pré-clínicos em modelo animal, a fim de obter cicatrização precoce, melhorar a incorporação da MDA, e diminuir a contração da ferida, melhorando assim significativamente o prognóstico. Demonstrando que os fibroblastos desempenham importante papel na cicatrização de feridas e reparo de tecidos^{28,120}. O mesmo vem ocorrendo na odontologia, onde esses tipos de culturas compostas têm sido empregadas no desenvolvimento de mucosa oral, demonstrando que em arcabouços colágenos, os fibroblastos povoam as matrizes, tornando-as mais fáceis de manipular, evitando a contração e diminuindo o tempo de cicatrização^{121,122}.

Fibroblastos humanos cultivados em matrizes de colágeno tridimensionais experimentam ambientes completamente novos, mais complexos e ricos física e geometricamente, relativos àqueles encontrados nas superfícies bidimensionais, mais comumente utilizados. Sobretudo, a estrutura fibrilar da matriz colágena 3D confere um ambiente mecanicamente complacente para as células, que proporcionam um efeito recíproco na mecânica da célula e da matriz. Estruturalmente, os fibroblastos apresentam uma morfologia característica mais alongada como *in vivo*. Porém, quando cultivados em monocamada, tendem a espalhar sobre um substrato 2D, adquirem uma parte superior (dorsal) e superfície inferior (ventral), aderências de células proeminentes seguindo a forma do substrato sobre a superfície ventral e crescem até a confluência com uma taxa de proliferação elevada. Quando colocados de volta em uma matriz 3D os fibroblastos perdem essa polaridade dorso-ventral artificial e recuperam a sua morfologia *in vivo*^{66,78,123}.

A morfologia dos fibroblastos, incluindo a organização do citoesqueleto e tipos de aderência celular, são mais semelhantes ao seu comportamento *in vivo* quando os fibroblastos são cultivados em matrizes 3D do que em matrizes 2D. Isto também é verdadeiro para suas características de sinalização intracelular^{64,66,78,124} em que tanto a composição quanto a rigidez da matriz influenciam^{66,78}.

Com relação à migração celular, os fibroblastos em matrizes 3D apresentam padrões distintos quando comparados àqueles em superfícies planas bidimensionais¹²⁵⁻¹²⁷. Particularmente, quando os fibroblastos estão em superfícies

2D, a força de tração contra o substrato rígido resulta em migração celular. Entretanto, quando encontram-se em uma matriz 3D colágena, a força de tração pode ser utilizada como um indutor mecânico para a remodelação tanto localmente quanto globalmente⁷⁹. Nestes tipos de matrizes, observa-se que os fibroblastos translocam-se 1.7 vezes mais rápido do que em matrizes 2D¹²⁸ e parecem usar um modo mesenquimal de migração, caracterizado por ciclos de protrusão, inserção e retração^{129,130}.

Funcionalmente, essas células em ambiente 3D demonstraram um aumento 2 vezes maior na taxa de proliferação e 1,5 na taxa de migração em comparação com as células cultivadas em superfícies de cultura 2D revestidas com laminina-1 ou colágeno IV⁶⁶. Também tem sido demonstrado que a síntese de colágeno pelos fibroblastos em culturas 2D é muito maior do que em uma matriz de colágeno 3D^{131,86}, o que pode ser resultado da distribuição 3D de fibras de colágeno em torno das células que induz uma inativação mitótica^{132,133} por um confinamento bioquímico¹³⁴. As moléculas sintetizadas e secretadas por fibroblastos são aprisionadas pela rede de colágeno do gel, inibindo a produção de colágeno^{135,136}.

Existe evidência de que a síntese de colágeno *in vivo* por fibroblastos humanos normais é muito mais lenta do que em culturas em mono camada^{86,137}. Uma diminuição de 6 a 8 vezes na biossíntese de colágeno tem sido descrita em matriz equivalente a tecido quando comparada a células em mono camada¹³¹.

2.5. Mucograft®

A pele porcina começou a ser utilizada, na área médica, na década de 60 no tratamento de queimaduras¹³⁸. Atualmente é a mais utilizada em enxertos heterólogos¹³⁹ e tem sido investigada como fonte de tecido rico em colágeno com potencial para ser utilizada como biomaterial devido à sua inerente biocompatibilidade, resistência mecânica e baixa imunogenicidade^{138,140-142}.

Dispositivos de colágeno de origem xenógena têm sido o foco de investigações durante anos na odontologia^{143,144}. Devido a suas propriedades químicas que conduzem a reações biológicas favoráveis, os dispositivos de

colágeno foram utilizados como membranas para regeneração óssea guiada (ROG) e em procedimentos de regeneração tecidual guiada (RTG), para conduta em alvéolos frescos, como agentes hemostáticos, e recentemente com a finalidade de aumentar a espessura de tecido queratinizado^{17,144-147}. Numerosos estudos pré-clínicos tem demonstrado angiogênese transmembranosa precoce, mas também rápida degradação das membranas colágenas xenogênicas nativas por atividade enzimática de células imunológicas¹⁴⁸⁻¹⁵⁰.

Recentemente, uma nova matriz colágena foi liberada pela FDA (Food and Drug Administration) e lançada nos EUA, entretanto no Brasil embora já esteja aprovada pelos órgãos competentes e lançada oficialmente, ainda não se encontra comercialmente disponível para toda a comunidade odontológica. O produto possui nome comercial de Mucograft® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland) e seu uso é indicado como um substituto para enxertos de tecido conjuntivo, podendo ser utilizado para aumento de tecido mole ao redor de dentes e implantes, em ROG, reconstrução de rebordo alveolar, fechamento de alvéolos, para cobertura de tecido ósseo exposto e para recobrimento radicular.

De acordo com o fabricante, a MCS-3D constitui uma matriz dérmica acelular produzida a partir da pele de porcos selecionados, sendo naturalmente obtido o colágeno tipo I e III. Em seguida, o colágeno é purificado para evitar possíveis reações alergênicas. No entanto as moléculas de colágeno já se apresentam unidas formando estruturas tridimensionais, sem a necessidade de processo químico para produzir este estado. Isto permite que a MCS-3D apresente maior estabilidade e a sua degradação que ocorre ao longo da cicatrização, não gera prejuízo aos tecidos gengivais já que não libera substâncias tóxicas. Matrizes colágenas produzidas através de processos químicos artificiais para reticular o colágeno possuem resquícios de produtos químicos na sua constituição, os quais são liberados nos tecidos gengivais quando ocorre a degradação destas matrizes durante cicatrização, podendo prejudicar os tecidos gengivais, inclusive gerar deiscências dos retalhos¹⁵¹.

Segundo o fabricante, este produto apresenta dupla camada com espessura total de aproximadamente 2,5 mm, sendo uma camada mais compacta, que tem efeito oclusivo, permitindo a aderência do tecido mole sobre a mesma, além de apresentar consistência elástica que facilita a sua sutura ao leito receptor. A segunda camada é mais espessa e porosa, fica voltada para o leito receptor,

adsorvendo o sangue, facilitando a deposição do coágulo e a formação de novos vasos sanguíneos além da integração com os tecidos do hospedeiro. Este material é projetado como uma matriz colágena reabsorvível para suportar crescimento tecidual e regeneração, dessa forma, a MCS-3D fornece suporte para migração celular para a mucosa culminando em regeneração^{17,152}. Por ser fabricada como matriz, apresenta benefícios sobre a forma em membrana por ser mais espessa tornando sua manipulação mais fácil e mais resistente às forças mastigatórias, resultando na ocorrência de cicatrização sem complicações¹⁵³.

Testes *in vitro* utilizando um biorreator, projetado especificamente, foram conduzidos para testar as propriedades mecânicas e biológicas da MCS-3D. Foi demonstrado que o protótipo promoveu o crescimento de fibroblastos humanos primários e que o carregamento dinâmico das MCS-3D cultivadas resultaram em uma expressão aumentada de proteínas extracelulares (colágeno tipo I e fibronectina). Estes resultados indicam a habilidade da MCS-3D para ser empregada como arcabouço para fibroblastos e para promover remodelação tecidual. Além disso, o cultivo de MCS-3D em um aparato de estimulação biomecânica resultou no endurecimento do biomaterial e no aumento da força máxima necessária para comprimi-la¹⁵⁴.

Em estudo pré-clínico, realizado em cães, Thoma et al.¹⁵⁵ investigaram o ganho de volume de tecido mole, em defeitos crônicos de rebordo, obtido a partir do uso de uma matriz colágena xenógena experimental, enxerto de tecido conjuntivo subepitelial (ETCSE) e rebordo mantido sem tratamento (controle). Para a detecção das mudanças de volume ocorridas ao longo do período experimental foi utilizado um método de escaneamento óptico 3D antes do procedimento cirúrgico, 28 e 84 dias pós-cirúrgico. Com isso, puderam observar que o ganho de volume obtido com MC foi similar ao obtido com ETCSE, e a diminuição relativa do volume de tecido mole entre 28 e 84 dias foi ligeiramente maior para o grupo MC (10%) do que para o grupo ETCSE (5.7%), sendo a diferença não significativa. Dessa forma, concluíram que a MCS-3D experimental demonstrou ganho de volume de tecido mole em um nível não inferior ao da técnica *gold standard* (ETCSE).

Com a finalidade de avaliar e comparar a tolerância local e desempenho de duas matrizes colágenas experimentais objetivando aumentar a faixa de tecido queratinizado através de análises macroscópicas e microscópicas, um estudo pré-

clínico com modelo experimental em porcos foi realizado. Foram criados defeitos gengivais padrões bilaterais de 1 cm de altura x 4 cm de largura na porção vestibular da mandíbula dos animais. Posteriormente, as áreas desnudas em cada hemimandíbula foram cobertas com uma das duas matrizes colágenas experimentais (M1- semelhante ao Mucograft® ou M2), cuja diferença entre elas era somente a fonte de colágeno, e o outro defeito foi deixado descoberto. As matrizes colágenas integraram-se bem aos tecidos circunjacentes com ausência de sinais de inflamação. Houve um aumento significativo tanto na espessura quanto na largura de tecido queratinizado ao longo do período experimental de 6 meses em ambos os grupos, revelando resultados levemente mais favoráveis para a MCS-M1 quando comparada à MCS-M2 com respeito à espessura de tecido queratinizado e para MCS-M2 quando comparada à MCS-M1 com respeito à largura de tecido queratinizado. Nenhuma diferença pôde ser observada para qualquer um dos parâmetros clínicos e histológicos avaliados entre as três modalidades de tratamento. Dessa forma, os autores puderam concluir que ambos os protótipos de MCS podem ser utilizados de maneira segura no aumento de tecido queratinizado¹⁸.

Mais recentemente, outro trabalho foi realizado com o uso de MCS-3D no tratamento de retrações gengivais, no entanto, com o objetivo de descrever os resultados clínicos e histológicos do uso da MCS-3D em combinação com retalho posicionado coronalmente, em modelo experimental em porcos. Foram selecionados 12 animais em que foram confeccionados defeitos de deiscência bilateralmente com 5 mm de altura x 4 mm de largura, apicalmente a junção cimento-esmalte (JCE), onde o lado teste recebeu interposição de MC e o lado controle não. Ambos os procedimentos reduziram significativamente a retração gengival e aumentaram a faixa de tecido queratinizado. Ao exame histológico, após 1 semana observaram que a MC foi bem tolerada pelo tecido conjuntivo circunjacente sem suscitar reação inflamatória pronunciada, além de observar-se a presença de fibroblastos imaturos e alta densidade de canais vasculares no interior da matriz. Após 1 mês, houve total integração da MCS-3D ao tecido conjuntivo subjacente, e após 3 meses, os tecidos atingiram completa normalidade sem diferenças entre os grupos de tratamento. Além disso, observaram no grupo teste a presença de epitélio juncional com menor dimensão (2.26 mm) quando comparado ao grupo controle (2.79 mm), por outro lado contra, a quantidade de novo cimento formado foi maior no grupo teste (1.08 mm)

do que no grupo controle (0.75 mm). Dessa forma, os autores puderam concluir que a MC demonstrou maior potencial de regeneração tecidual, caracterizada por um epitélio juncional com menores dimensões e maior formação de novo cemento²¹.

Com objetivo de avaliar a eficácia da MCS-3D em estabelecer faixa de tecido queratinizado quando comparada clinicamente ao enxerto de tecido conjuntivo (ETC), sendo ambos aplicados de forma livre ao redor de dentes ou implantes com pouco tecido queratinizado (≤ 1 mm). Após 6 meses, observou-se que uma quantidade significativa de gengiva queratinizada foi alcançada com ambos os procedimentos cirúrgicos, ETC e MC, com média de largura de 2.60 mm e 2.50 mm, respectivamente. A maior parte da contração do enxerto ocorreu durante o primeiro mês de cicatrização, tanto no grupo ETC quanto no MCS-3D (60% e 67%, respectivamente), e as diferenças entre 1 mês e 1 ano foram pequenas em ambos os grupos (ETC 17% e MC 8%). Embora os resultados clínicos obtidos com ambos os procedimentos cirúrgicos tenham sido similares, houve diferenças significativamente estatísticas em termos de morbidade do paciente e redução do tempo cirúrgico, favorecendo o grupo MCS-3D. Grande parte desta morbidade foi associada à necessidade do segundo sítio cirúrgico (palato) para obtenção do enxerto conjuntivo¹⁷.

Em 2011, uma nova investigação com objetivo de avaliar a eficiência da MCS-3D em obter faixa de tecido queratinizado foi realizada por Nevins e colaboradores¹⁹. Nesta ocasião, um relato de caso abrangendo 5 pacientes com quantidade de tecido queratinizado ≤ 2 mm bilateralmente em dentes posteriores inferiores, em que um dos lados foi tratado com enxerto de MCS-3D (teste) e o outro com enxerto gengival livre (EGL – controle), sendo ambos aplicados livremente. O acompanhamento ocorreu por um período de até 12 meses e demonstrou que tanto o lado teste quanto o controle obtiveram cicatrização normal e aumento de tecido queratinizado estatisticamente significante. Entretanto, o contorno, cor e textura dos enxertos de MCS-3D se misturaram muito bem ao tecido adjacente, enquanto houve fronteiras visíveis que delimitaram as áreas tratadas com EGL, com contorno e cor diferentes dos tecidos circundantes. Aproximadamente após 13 semanas, foi realizada biópsia em 4 dos pacientes envolvidos no estudo, e os achados histológicos demonstraram-se notavelmente similares em ambos os grupos, com tecido conjuntivo maduro coberto por epitélio queratinizado bem formado, e sobre o

qual pequena faixa de tecido ortoqueratinizado. Células inflamatórias estavam notavelmente ausentes, e pequeno remanescente fibroso da MCS-3D foi a única evidência de que um material de enxerto foi previamente utilizado naquela região. Sendo assim, concluiu-se que a MCS-3D constitui uma alternativa viável ao EGL para aumento de tecido queratinizado em áreas deficientes.

Posteriormente, Herford et al.¹⁵³ utilizaram a MCS-3D como substituto ao ETC no tratamento de defeitos de tecido mole. Foram realizadas 30 cirurgias para recriar os tecidos moles perdidos, em defeitos que variavam de 50 a 900 mm². A maioria dos casos tratados tinham indicação protética (22 casos), seguidos por tratamento de tumor (5 casos) e trauma (3 casos). O acompanhamento ocorreu em média 22 meses e os resultados demonstraram uma contração média da área enxertada de 14%, sendo o enxerto degradado entre 3 e 10 semanas, de acordo com o seu uso e tratamento empregado. A matriz apresentou reepitelização entre 4 e 8 semanas, com maior demora em defeitos mais amplos. Procedimentos para aumento ganho de vestibulo apresentaram resultados em 2 e 10mm, com média de 3,4mm. Também foi relatada a capacidade hemostática da MCS-3D e ausência de cicatrizes.

A MCS-3D também já foi utilizada no tratamento de retrações gengivais²⁰, sendo comparado ao ETCSE. Foram tratados 25 pacientes, em modelo de boca dividida, com acompanhamento de 12 meses. Ambos os lados receberam retalho posicionado coronalmente (Langer & Langer, 1985), sendo que o lado controle recebeu ETCSE e o lado teste recebeu a MCS-3D. Após 6 meses, o grupo teste apresentou recobrimento radicular de 83,5% enquanto o grupo controle apresentou 97%, com diferença estatística entre eles ($p=0,0059$). Aos 12 meses o grupo teste apresentou recobrimento radicular de 88,5% comparado ao 99,3% do grupo controle ($p=0,0313$). Embora exista diferença estatística no recobrimento radicular entre os tratamentos, clinicamente os autores afirmaram que os resultados são difíceis de serem distinguidos e após exclusão de quatro pacientes, que apresentaram problemas durante o período de avaliação, a porcentagem de recobrimento radicular passou a não demonstrar significância entre os grupos. Tanto o uso de ETCSE como da MCS-3D foram capazes de aumentar a faixa de tecido queratinizado (1,34 para o grupo teste contra 1,26 para o grupo controle), sem diferença estatística entre os tratamentos. Os autores concluíram que a MCS-3D é uma alternativa para o uso de ETCS para o tratamento de retrações gengivais.

Posteriormente, alguns relatos de caso clínico demonstraram que o uso da MCS-3D é capaz de aumentar o tecido queratinizado tanto em altura como em espessura além de atingir recobrimento radicular adequado tanto quando associado ao retalho estendido avançado coronalmente²² como ao retalho avançado coronalmente²³. Camelo et al.²⁴ descreveram recobrimento radicular entre 83 e 100% e ganho de tecido queratinizado de 3 mm. Sob avaliação histológica, 4 meses após procedimento cirúrgico, foi demonstrado que a MCS-3D continuou sendo evidente microscopicamente, entretanto em processo de reabsorção exibindo infiltrado inflamatório bastante restrito. Obtendo cicatrização por meio de epitélio juncional longo e inserção conjuntiva quando da associação de retalho avançado coronalmente e MCS-3D.

Da mesma forma, Mandelaris et al.¹⁵⁶, em relato de caso, onde foi empregada MC como substituta ao ETCS simultaneamente à instalação de implante em estágio único, demonstraram que a análise histológica de tecido coletado no lado contralateral ao lado teste, que não foi submetido a procedimento cirúrgico, revelou gengiva inserida de aparência normal com epitélio escamoso estratificado e tecido conjuntivo subjacente (lâmina própria) 10 semanas após a instalação do implante. Similarmente, o lado teste, onde foi empregado MCS-3D, o epitélio escamoso e a lâmina própria também se apresentaram normais, com crescimento tecidual para o interior da MCS-3D, e ausência de células inflamatórias (linfócitos ou macrófagos). Além disso, observaram vasos sanguíneos crescendo no interior da matriz, sendo desta forma, os lados teste e controle considerados comparáveis em termos de tecido conjuntivo e organização vascular.

PROPOSIÇÃO

---

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, morfológica, bioquímica e imunohistoquimicamente, se a matriz colágena de origem suína é uma matriz tridimensional adequada para o crescimento, *in vitro*, de fibroblastos gengivais humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

---

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultura de Células

As células utilizadas nesse estudo foram obtidas de três indivíduos saudáveis, não fumantes, sem doenças sistêmicas e sem doença periodontal ou qualquer outra infecção bucal, que precisassem ser submetidos à cirurgia periodontal envolvendo a remoção de tecido gengival saudável. Fibroblastos gengivais humanos foram cultivados a partir da técnica do explante como descrito previamente por Somerman *et al.*¹⁵⁷ com algumas modificações. O tecido gengival removido foi desepitelizado, submetido a duas lavagens com solução salina, e armazenado em tubos de 50 mL[†], contendo meio de transporte – Meio de Dubelcco Modificado por Eagle (DMEM[‡], da sigla em inglês), 2,5 µg/mL de vancomicina[§], 250 µg/mL de gentamicina[‡] e 0,3 µg/mL de fungizona[‡]. Após 3 lavagens de 15 min cada, com o meio de transporte, o tecido foi colocado em uma placa de Petri, dividido em fragmentos de aproximadamente 1 mm³ com lâmina cirúrgica e transferido para garrafas de 25 cm^{2¶} contendo D10 [DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino[‡] (SFB), 50 µg/mL de vancomicina[§], 50 µg/mL de gentamicina[‡] e 50 ng/mL de fungizona[‡]. As culturas foram incubadas a 37°C e mantidas em atmosfera úmida com 5% de CO₂, e o meio foi trocado a cada 48 horas. Após confluência, os fibroblastos foram destacados das garrafas com solução de tripsina a 0.05% e EDTA[‡], seguido de inativação com meio de cultura. As células destacadas e inativadas foram centrifugadas por 5 min a 2000 rpm, o pellet formado foi ressuspensionado em novo meio de cultura e transferido para garrafas de 75 cm^{2*}. Células entre a segunda e terceira passagem foram cultivadas sobre a MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D na densidade de 1 x 10⁶ células por poço, durante períodos de até 10 dias (Figura 1). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil (Protocolo no. 2007.1.1234.58.5).

[†] Corning Incorporated, NY, USA

[‡] Gibco BRL Invitrogen, Gaithersburg, MD

[§] Acros Organics, Gell, Belgium

[‡] Gibco BRL Invitrogen, Gaithersburg, MD

[¶] Nunc, Roskilde, Denmark

^{*} Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA

Figura 1. Cultura de fibroblastos: A) Fragmentos de tecido conjuntivo gengival em uma garrafa de 25 cm². B) Início da cultura com fibroblastos espraçando-se a partir do explante. C) Fibroblastos em confluência.

4.2. Cultura de Tecido

4.2.1. Mucograft®

Primeiramente, uma matriz de 20 x 30 mm foi dividida em 6 fragmentos de aproximadamente 10 x 10 mm cada, em uma placa de Petri, com o auxílio de sonda periodontal milimetrada e lâmina cirúrgica nº 15. As amostras de MCS-3D foram posicionadas em placas de poliestireno de 6 poços, sobre lamínulas de vidro^{††} previamente coladas ao fundo da placa com 10 µL de colágeno 3D. As amostras foram estabilizadas sobre as lamínulas de vidro por meio de fixação com 15 µL de colágeno 3D, por fim as células foram plaqueadas na densidade de 1×10^6 células/poço sobre a MCS-3D pelo método *over lay* (Figura 2).

^{††} Fisher Scientific

Figura 2. Cultura em Tecido – Mucograft®: A) MCS-3D utilizada no experimento. B) Medida realizada com sonda periodontal para orientar a divisão da MCS-3D originalmente com 20 x 30 mm. C) MCS-3D sendo dividida em fragmentos com lâmina cirúrgica. D) Fragmento de MCS-3D com 10 x 10 mm. E) Fragmentos de MCS-3D. F) Preparação da placa de 6 poços. G) Lamínulas de vidro fixadas em placa de 6 poços. H) Amostras de MCS-3D aderidas a placa de 6 poços. I) Poço contendo MCS-3D + células.

4.2.2. Colágeno Bovino Tridimensional

Para a preparação do arcabouço colágeno tridimensional foi utilizado Colágeno bovino tipo I^{†††} (Collagen I, bovine, 30 mg), de acordo com as informações do fabricante. O colágeno apresenta-se em forma líquida com concentração de 3 mg/mL. Primeiramente, foi adicionado salina tamponada com fosfato (PBS)^{‡‡‡} ao volume inicial do colágeno para obtenção de uma concentração de 2 mg/mL. Além disso, foram acrescentados D10 e solução de NaHCO₃ e NaOH, obtendo-se uma solução final com pH de 7.4 ± 0.2 . Após a junção de todos os componentes em tubo

^{†††} BD Biosciences, MA

^{‡‡‡} Gibco

falcon de 15 mL, procedeu-se homogeneização, seguida por inserção de 250 μ L da solução final em dispositivo de teflon de 10 x 10 x 2 mm sobre lamínula de vidro previamente fixada a placa de poliestireno de 6 poços com 10 μ L de colágeno 3D, com a finalidade de obter um material com mesmo tamanho e formato que o material teste. Em seguida, as placas foram mantidas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico por 20 min a 37°C para promover gelificação da matriz. Por fim, as células juntamente com 1 mL de D10 foram plaqueadas na densidade de 1 x 10⁶ células/poço pelo método *over lay* (Figura 3).

Figura 3. Cultura em Tecido: Colágeno Bovino Tridimensional: A) Colágeno bovino tipo I. B) Preparação da placa de 6 poços. C) Lamínula de vidro fixada ao fundo da placa de 6 poços. D) Dispositivo de teflon de 10 x 10 x 2 mm colocado sobre lamínula de vidro. E) Arcabouço colágeno tridimensional inserido em dispositivo de teflon sobre lamínula de vidro. F) Poço contendo ColB-3D + células.

4.2.3. Colágeno Bovino Bidimensional

Para a preparação do arcabouço colágeno bidimensional, foi utilizado também o Colágeno bovino tipo I (Collagen I, bovine, 30 mg). Para tanto, a solução inicial de colágeno foi diluída (50 μ g/mL do colágeno diluído em PBS) de acordo com as informações do fabricante. Em seguida, 100 μ L dessa solução foi colocada sobre cada lamínula de vidro fixada em placa de 6 poços com 10 μ L de colágeno 3D e

mantidas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico por 1 hora a 37°C. Após este período, a solução remanescente de colágeno 2D sobre cada lamínula foi aspirada, seguida pelo plaqueamento das células na densidade de 1×10^6 células/poço juntamente com 1 mL de D10 (Figura 4).

Figura 4. Cultura de Tecido - Colágeno Bovino Bidimensional: A) Colágeno bovino tipo I. B) Preparação da placa de 6 poços. C) Lamínula de vidro fixada ao fundo da placa de 6 poços. D) Solução de ColB-2D sobre lamínula de vidro. E) Remoção do excesso de ColB-2D. F) Poço contendo ColB-2D + células.

4.3. Morfologia e Distribuição Celular na MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D

Em 3, 7 e 10 dias, as amostras de MCS-3D; ColB-2D; e ColB-3D + células foram fixadas em paraformaldeído a 4% em solução de fosfato tamponado a 0.1M, pH 7.2 (PB, da sigla em inglês), por 10 min à temperatura ambiente (TA), para avaliar morfologia e distribuição celular pelo método da fluorescência direta¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Após serem lavadas em PB, as culturas foram processadas rotineiramente para a marcação de fluorescência. Resumidamente, as amostras foram permeabilizadas em Triton X-100 a 0,5%^{††††} com solução PB por 10 min, seguido de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por 30 min. Na sequência, procedeu-se à incubação

^{††††} Acros Organiscs

com faloidina conjugada com Alexa fluor 488^{††††} (fluorescência verde, 1:200), por 50 min, em ambiente úmido, ao abrigo de luz e à TA, para detecção do citoesqueleto de actina. Após lavagem em PB, os núcleos celulares foram marcados com 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI, fluorescência azul)^{††††} a 300 nM por 5 min e as amostras foram lavadas rapidamente com água destilada. Após montagem com meio anti-fade^{‡‡‡‡} as amostras foram analisadas sob escaneamento a laser em microscópio de fluorescência confocal Leica SP2^{§§§§}, utilizando o software LCS LITE^{§§§§}. As imagens foram capturadas através das objetivas planas acromáticas de 20 x 0.7/óleo de imersão e 40 x 1.25/óleo de imersão, com formato de 1024 x 1024 pixels. As imagens digitais adquiridas foram processadas utilizando o software Image J^{¶¶¶¶}. O número total de células na matriz foi determinado por meio de contagem nas amostras marcadas por fluorescência direta.

4.4. Localização de proteínas da matriz extracelular não colágena e de proteínas do citoesqueleto

Nos períodos 3, 7 e 10 dias, as amostras foram fixadas em metanol absoluto^{*****} por 10 min à -20°C, para a imunolocalização de proteínas da matriz extracelular não-colágena – fibronectina e proteínas do citoesqueleto – actina e tubulina por imunofluorescência indireta. Em seguida, as células foram processadas rotineiramente como descrito anteriormente¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Cada amostra foi lavada 3 vezes por 5 min em PB, seguida por bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por 30 min. Utilizaram-se anticorpos primários monoclonais para tubulina (1:200)^{*****}, actina (1:100)^{*****}, e fibronectina (1:100, clone IST-3)^{*****}, seguidos de anticorpos secundários goat anti-mouse (1:200)^{††††} conjugados com fluoróforo Alexa Fluor 594 (fluorescência vermelha; 1:200). Todas as incubações dos anticorpos foram feitas em atmosfera úmida por 60 min a TA. Entre cada incubação, as amostras foram lavadas três vezes

†††† Molecular Probes, Eugene, OR

‡‡‡‡ Vectashield

§§§§ Leica

¶¶¶¶ National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland

***** Merck, Darmstadt, Germany

***** Sigma-Aldrich, St Louis, EUA

(5 min cada) em PB. Antes da montagem para observação microscópica, os núcleos celulares foram marcados com DAPI (fluorescência azul)⁺⁺⁺⁺⁺ a 300 nM por 5 min e as amostras foram lavadas rapidamente com água deionizada. As amostras foram montadas em lâminas de vidro, seguidas pela montagem de lamínula de vidro⁺⁺⁺⁺⁺ de 12 mm com meio de montagem *anti-fade*^{sssss} sobre as superfícies contendo células, com exceção das amostras de ColB-2D cultivadas sobre lamínulas de vidro revestida com colágeno que foram viradas diretamente sobre lâmina de vidro com o mesmo meio de montagem. Posteriormente as amostras foram examinadas em microscópio confocal SP2^{TTTTT} e as imagens adquiridas foram processadas com o programa Image J^{*****}.

4.5. Proliferação Celular por imunolocalização do antígeno nuclear Ki-67

Em 3, 7 e 10 dias, foi determinada a proporção de células no ciclo celular por imunomarcção ao antígeno nuclear ki-67, expresso apenas por células no ciclo celular e não por células em G0¹⁶¹ nos diferentes grupos (MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D). Inicialmente as amostras foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 (PB), por 10 minutos à TA. Em seguida, as células foram processadas rotineiramente para imunofluorescência indireta¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. As células foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 a 0,5%^{yyyyy} em PB por 10 min, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por 30 min. Utilizou-se anticorpo primário policlonal para ki-67 (1:70,)^{ooooo}, seguido de anticorpo secundário goat anti-rabbit 594 (1:200,)^{BBBBB} conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 594 (fluorescência vermelha; 1:200,) em mesma solução de faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (fluorescência verde; 1:200)⁺⁺⁺⁺⁺, para visualização do

---

⁺⁺⁺⁺⁺ Molecular Probes

⁺⁺⁺⁺⁺ Fisher Scientific

^{sssss} Vectashield

^{TTTTT} Leica

^{*****} National Institute of Mental Health

^{yyyyy} Acros Organics, Geel, Belgium

^{ooooo} Diagnostic Biosystems, Pleasanton, EUA

^{BBBBB} Molecular Probes; Invitrogen

⁺⁺⁺⁺⁺ Molecular Probes

citoesqueleto de actina. Todas as incubações dos anticorpos foram feitas em atmosfera úmida por 60 min à temperatura ambiente. Entre cada incubação, as amostras foram lavadas três vezes em PB por 5 min. Antes da montagem para observação microscópica, as amostras foram lavadas rapidamente com água deionizada e os núcleos celulares, marcados com DAPI⁺⁺⁺⁺⁺ a 300 nM por 5 min. As amostras foram montadas em lâminas de vidro, e em seguida, após montagem de lamínula de vidro de 12 mm⁺⁺⁺⁺⁺ com meio de montagem *anti-fade*^{ssssss} sobre as superfícies contendo células, as amostras foram examinadas em microscópio confocal SP2^{TTTTT}. As imagens adquiridas foram processadas com o programa Image J^{*****}.

4.6. Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada quantitativamente através do ensaio colorimétrico MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)^{*****} (5mg/mL de PBS). O MTT é um sal que é reduzido em cristais de formazan (de cor púrpura) por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis¹⁶². Em 3, 7 e 10, as amostras foram transferidas para novos poços e incubadas com MTT a 10% em meio de cultura, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico por 4 horas a 37°C. Após esse período, o meio foi então aspirado dos poços, e as culturas foram lavadas gentilmente com 1 mL de PBS aquecido. Em seguida, foi adicionado 1 mL de isopropanol ácido (HCl 0.04 N em isopropanol) a cada poço e as placas foram mantidas sob agitação em agitador de placas por 5 min, em velocidade constante, para solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 150 µL da solução foram transferidas para uma placa de 96 poços^{ssssss} para medida colorimétrica em espectrofotômetro

---

+++++ Fisher Scientific

ssssss Vectashield, Vector Labs, Burlingame, EUA

TTTTT Leica

***** National Institute of Mental Health

***** Sigma

ssssss Corning Incorporated, NY, EUA

µQuant®, utilizando o comprimento de onda de 570nm. Para controle negativo foi utilizada uma amostra da MCS-3D. Os dados foram expressos em absorbância.

4.7. Análise estatística

Os dados apresentados neste trabalho representam as médias dos resultados de três culturas, estabelecidas a partir de três pacientes diferentes. Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3) para os ensaios de MTT e fluorescência direta e em duplicata (n=2) para a imunofluorescência indireta. Inicialmente todas as variáveis foram testadas em relação à normalidade dos dados.

O teste de Friedman foi utilizado para comparação intra e intergrupos para as variáveis da análise de expressão das proteínas: fibronectina, actina e tubulina. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparações intra e intergrupos, seguido do teste de Tukey para as variáveis das análises de viabilidade, proliferação e número total de células.

RESULTADOS

---

5. RESULTADOS

5.1. Morfologia e distribuição de células na MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D

Ao final dos períodos de 3, 7 e 10 dias, as células cultivadas sobre MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D foram submetidas à fluorescência direta para a avaliação de presença, morfologia e distribuição. A epifluorescência revelou que em 3 dias os FGH apresentavam-se aderidos em todos os grupos experimentais (Fig. 5A-C). FGH cultivados sobre ColB-2D exibiram forma menos alongada, ampla e achatada com maior quantidade de projeções e numerosas fibras de estresse em todos os períodos experimentais (Fig. 5A, D e G). Por outro lado, os FGH cultivados sobre ColB-3D e MCS-3D em 3, 7 e 10 dias demonstraram fenótipo fusiforme, alongado ou cilíndrico com menor quantidade de projeções do que observado no substrato 2D (Fig. 5C, B, E, F, H e I) com algumas das células cultivadas sobre MCS-3D demonstrando aspecto estrelado (Fig. 5F e I). Na MCS-3D e ColB-3D os FGH distribuíram-se de forma irregular formando uma rede celular por toda a matriz interligados por junções. Na MCS-3D observou-se maior concentração de células, formando verdadeiros aglomerados, na camada menos compacta (Fig. F) do que na camada com maior densidade de fibras (Fig. 5C-I), onde as células apresentaram-se mais espaçadas em todos os períodos estudados. Já no ColB-2D houve espraiamento formando uma camada contínua de células, que aos 3 dias demonstrava aproximadamente 80% de confluência (Fig. 5A), estando 100% confluyente no 7º e 10º dia (Fig. 5D e G).

Figura 5. Epifluorescência de cultura de FGH em ColB-2D (A, D e G), ColB-3D (B, E e H) e MCS-3D (C, F e I), em 3, 7 e 10 dias. Fluorescência verde revela o citoesqueleto de actina, e azul, núcleos celulares. Nota-se em: A, D e G, FGH menos alongados, mais amplos e achatados com maior projeção de fibras de estresse, distribuídos de forma regular, com poucos espaços vazios em A e completamente preenchidos em D e G; em C, B, E, F, H e I, FGH com fenótipo fusiforme, alongado ou cilíndrico com menor quantidade de projeções, distribuídos de forma irregular formando rede celular por toda matriz interligados por junções; em F e I aspecto estrelado característico de alguns FGH cultivados sobre MCS-3D. Barra para A-I = 100µm e para detalhes A-I = 35 µm.

5.2. Viabilidade celular

O ensaio de MTT, comparando a viabilidade celular entre os três diferentes grupos experimentais, aos 3, 7 e 10 dias, indicou maior viabilidade celular em culturas crescidas sobre MCS-3D em 3 dias do que em 7 e 10 dias, com diferença estatisticamente significativa apenas entre 3 e 7 dias ($p=0,006$). Com relação à avaliação intergrupos, em 3 dias FGH cultivados sobre MCS-3D apresentaram maior viabilidade do que aqueles cultivados sobre ColB-3D ($p<0,001$), da mesma forma, FGH cultivados sobre ColB-2D apresentaram maior viabilidade do que aqueles cultivados sobre ColB-3D ($p<0,001$), evento este que se repetiu nos períodos experimentais de 7 e 10 dias (Figura 6).

Figura 6. Medida da viabilidade celular de FGH em matriz colágena suína tridimensional (MCS-3D), colágeno bovino bidimensional (ColB-2D) e colágeno bovino tridimensional (ColB-3D) determinada pelo ensaio colorimétrico MTT, expressa em absorbância em 3, 7 e 10 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) para a comparação intergrupos e intragrupos.

5.3. Número total de células

O número total de células presente nas amostras dos diferentes grupos experimentais foi determinado através de contagem por epifluorescência. A tabela 1 mostra a média do número de células presentes nas amostras de MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D nos períodos avaliados. Em 3 dias foi observado maior número de células nas amostras de ColB-2D seguido por MCS-3D e ColB-3D respectivamente, havendo diferença estatística entre ColB-2D e MCS-3D ($p<0,001$) e entre ColB-2D e ColB-3D ($p<0,001$). Em 7 dias houve redução no número de células no ColB-2D e aumento na MCS-3D e ColB-3D, e o número de células foi significativamente superior no ColB-2D com relação a MCS-3D ($p=0,002$). No décimo dia foi observado aumento no número de células em todos os grupos experimentais, sendo o número de células, mais uma vez, significativamente superior no ColB-2D do que na MCS-3D ($p=0,005$). Entre 3 e 10 dias houve um aumento significativo no número total de células no ColB-3D o qual apresentou maior quantidade de células no período de 10 dias (Figura 7).

Figura 7. Curva de crescimento de FGH presentes em matriz colágena suína tridimensional (MCS-3D), colágeno bovino bidimensional (ColB-2D) e colágeno bovino tridimensional (ColB-3D) em 3, 7 e 10 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Tabela 1. Média do número total de células presentes na MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D em 3, 7 e 10 dias.

	Período (dias)	MCS-3D	ColB-2D	ColB-3D	*p-valor
N total de células	3	100,3 ± 51,4 ^b	383,0 ± 220,9 ^{ab}	71,2 ± 61,7 ^{ABa}	<0,001*
	7	117,4 ± 55,7 ^a	280,1 ± 0,2 ^a	217,8 ± 130,0 ^B	0,002*
	10	163,6 ± 89,7 ^a	346,5 ± 128,6 ^a	375,3 ± 289,8 ^A	0,005*
**p-valor		NS**	NS**	<0,001**	

MCS-3D: Matriz colágena suína tridimensional; ColB-2D: Colágeno bovino bidimensional; ColB-3D: Colágeno bovino tridimensional; NS (Não significante – $p > 0,05$).

*Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Tukey para comparações intergrupos.

**Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Tukey para comparações intragrupos.

Letras maiúsculas indicam diferença intragrupo e as minúsculas diferença intergrupo. Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na análise comparativa múltipla.

Grupos que compartilham pelo menos uma letra são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

5.4. Proliferação celular

A proporção de células em proliferação nas amostras dos diferentes grupos experimentais foi determinada em 3, 7 e 10 dias, através de contagem por epifluorescência das células expressando o antígeno nuclear Ki-67, evidenciado pela técnica de imunofluorescência indireta. Os resultados demonstraram maior porcentagem de FGH no ciclo celular (G0) crescidos sobre ColB-2D seguidos por ColB-3D e MCS-3D, respectivamente, em todos os períodos experimentais. Na MCS-3D praticamente não houve marcação por Ki-67 e o ColB-2D apresentou redução significativa de FGH ciclando entre o período de 3 e 10 dias ($p = 0,036$) (Figura 8).

Figura 8. Proliferação de FGH crescidos sobre MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D, expressa em valores de % em 3, 7 e 10 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a comparação intergrupos e intragrupos.

5.5 Expressão de proteínas da matriz extracelular não colágena – fibronectina (FIBRO) e das proteínas do citoesqueleto – tubulina (TUB) e actina (ACT).

A expressão das proteínas da MEC não colágena – fibronectina e do citoesqueleto – tubulina e actina foi determinada através da quantificação de expressão das proteínas evidenciada pela técnica de imunofluorescência indireta, nas amostras dos diferentes grupos experimentais em 3, 7 e 10 dias.

5.5.1. Expressão de Fibronectina

Em 3 dias foi observada maior expressão de fibronectina por célula no ColB-3D seguido por ColB-2D e MCS-3D, o que se manteve no período de 7 dias e sofreu ligeira modificação aos 10 dias, onde a MCS-3D apresentou um pequeno aumento na expressão enquanto ColB-2D e ColB-3D experimentaram redução. Na avaliação intragrupo, foi observado aumento da expressão por célula no ColB-2D e ColB-3D

entre 3 e 7 dias e redução entre 7 e 10 dias, na MCS-3D houve aumento na expressão no decorrer do período experimental. No entanto, embora tenha sido observada diferença numérica inter e intragrupos esta não demonstrou significância (Figura 9 e 10).

Figura 9. Expressão de Fibronectina por FGH crescido sobre MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Tabela 2. Média da expressão de proteína da matriz extracelular não colágena - fibronectina (FIBRO) e das proteínas do citoesqueleto - tubulina (TUB) e actina (ACT) por FGH na MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D em 3, 7 e 10 dias.

	Período (dias)	MCS-3D	ColB-2D	ColB-3D	*p-valor
FIBRO	3	4,5 ± 3,0	34,9 ± 6,5	37,9 ± 36,6	NS
	7	23,7 ± 9,9	33,9 ± 28,1	77,0 ± 23,5	NS
	10	34,1 ± 8,4	18,5 ± 4,9	66,8 ± 19,4	NS
**p-valor		NS	NS	NS	
TUB	3	18 ± 6,1	20 ± 7,4	36 ± 37,1	NS
	7	15 ± 11,6	31 ± 11,8	52 ± 24,2	NS
	10	21 ± 11,8	26 ± 16,7	13 ± 4,3	NS
**p-valor		NS	NS	NS	
ACT	3	26,6 ± 2,7	7,2 ± 1,5	0,0 ± 0,0 ^A	NS
	7	6,6 ± 0,4	10,4 ± 0,6	22,1 ± 8,2 ^A	NS
	10	2,2 ± 0,8	8,0 ± 0,8	16,2 ± 2,7	NS
**p-valor		NS	NS	<0.05	

MCS-3D: Matriz colágena suína tridimensional; ColB-2D: Colágeno bovino bidimensional; ColB-3D: Colágeno bovino tridimensional; NS (Não significante – $p > 0,05$).

*Teste de Friedman para comparações múltiplas intragrupos.

**Teste de Friedman para comparações múltiplas intergrupos.

Letras maiúsculas indicam diferença intragrupo.

Grupos que compartilham pelo menos uma letra são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Figura 10. Epifluorescência de cultura de FGH em ColB-2D (A, D e G), ColB-3D (B, E e H) e MCS-3D (C, F e I), em 3 (A-C), 7 (D-F) e 10 (G-I) dias. Fluorescência vermelha (anticorpo secundário conjugado com Alex Fluor 594) indica marcação com anticorpo anti-fibronectina e azul (marcação de DNA por DAPI), os núcleos celulares. A marcação de fibronectina em culturas crescidas sobre ColB-2D exibia aspecto fibrilar típico, enquanto em ColB-3D e MCS-3D predominava um aspecto puntiforme e compacto. Barra para A-I = 100µm e para detalhes A-I = 35 µm.

5.5.2. Expressão de Actina

Em 3 dias foi observada maior expressão de actina por célula na MCS-3D seguida por ColB-2D. No sétimo dia houve uma redução da expressão por célula na MCS-3D e aumento no ColB-2D e ColB-3D. Contudo não houve diferença estatística significativa na análise intergrupos. Ao final do período experimental observou-se uma redução na expressão por células em todos os grupos experimentais. Na comparação intragrupos observou-se expressão significativamente maior na expressão por célula no ColB-3D no período de 7 dias do que em 3 dias ($p < 0,05$) (Figura 11 e 12).

Figura 11. Expressão de Actina por FGH crescido sobre MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a comparação intragrupos.

Figura 12. Epifluorescência de cultura de FGH em ColB-2D (A, D e G), ColB-3D (B, E e H) e MCS-3D (C, F e I), em 3 (A-C), 7 (D-F) e 10 (G-I) dias. Fluorescência vermelha (anticorpo secundário conjugado com Alex Fluor 594) indica marcação com anticorpo anti-actina e azul (marcação de DNA por DAPI), os núcleos celulares. Aos 3 dias, a marcação para actina era notada de forma difusa pelo citoplasma celular em células cultivadas sobre ColB-2D (detalhe em A), enquanto aquelas crescidas sobre ColB-3D e MCS-3D exibiam um padrão puntiforme (detalhe em B e C). Aos 7 e 10 dias, células cultivadas sobre ColB-2D exibiam feixes de filamentos de actina bem delimitados por todo citoplasma (detalhe em D e G), enquanto aquelas crescidas sobre as matrizes 3D demonstravam filamentos de actina arranjados de forma compacta (detalhes E-F; H-I). Barra para A-I = 100µm e para detalhes A-I = 35 µm.

5.5.3. Expressão de Tubulina

Em 3 dias foi observada maior expressão de tubulina por célula no ColB-3D do que no ColB-2D e na MCS-3D, com o ColB-2D demonstrando expressão ligeiramente superior a MCS-3D e ColB-3D demonstrando expressão superior a MCS-3D e ColB-2D, entretanto, sem diferenças estatísticas. Em 7 dias houve aumento da expressão por célula no ColB-2D e ColB-3D e redução na MCS-3D, embora a expressão tenha sido numericamente superior no ColB-3D em relação ao ColB-2D, não houve diferença significativa. Ao final do período experimental houve maior expressão por células no ColB-2D seguido por MCS-3D e ColB-3D, sem diferenças significativas entre os grupos. Na comparação intragrupos, foi observado aumento da expressão por células no ColB-3D entre 3 e 7 dias e redução entre 7 e 10 dias acentuados, no entanto, sem significância (Figura 13 e 14).

Figura13. Expressão de Tubulina por FGH crescido sobre MCS-3D, ColB-2D e ColB-3D. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Figura 14. Epifluorescência de cultura de FGH em ColB-2D (A, D e G), ColB-3D (B, E e H) e MCS-3D (C, F e I), em 3 (A-C), 7 (D-F) e 10 (G-I) dias. Fluorescência vermelha (anticorpo secundário conjugado com Alex Fluor 594) indica marcação com anticorpo anti-tubulina e azul (marcação de DNA por DAPI), os núcleos celulares. As células cultivadas sobre as três superfícies exibiam expressão da proteína citoesquelética tubulina. Aos 3, 7 e 10 dias, a marcação para tubulina em células crescidas sobre ColB-2D, ColB-3D e MCS-3D era caracterizada por arranjos filamentosos que se projetavam da região nuclear e se estendiam pelo citoplasma celular. Contudo, aos 7 dias, um número significativo de células cultivadas sobre ColB-3D exibiam marcação predominantemente na região perinuclear (detalhe em H). Barra para A-I = 100µm e para detalhes A-I = 35 µm.

DISCUSSÃO

---

6. DISCUSSÃO

A engenharia de tecidos representa importante avanço na área da medicina regenerativa. A literatura periodontal já apresenta relatos do uso de técnicas de engenharia tecidual que envolvem o crescimento de células do próprio hospedeiro em diferentes arcabouços, para serem usadas como substitutos a enxertos autógenos^{34,44,175}. No entanto, existem ainda algumas falhas na determinação de biomateriais que possam ser empregados como substitutos aos enxertos de tecidos moles autógenos¹⁵⁵.

O presente estudo avaliou o comportamento dos FGH cultivados sobre MCS-3D, com o propósito de analisar a eficácia dessa matriz como arcabouço 3D. Para tanto, a MCS-3D foi comparada a um substrato colágeno 2D, amplamente discutido na literatura⁶⁶⁻⁷⁰, e a um gel de colágeno 3D. O gel de colágeno tem sido um dos arcabouços mais utilizado para cultura celular na engenharia tecidual^{78,79,108,117,126}, sendo assim, consideramos interessante iniciar nossos experimentos já com uma matriz bastante conhecida na literatura, utilizando-o como controle 3D.

Em estudo *in vitro*, Bell *et al.*¹¹³ descreveram cultura de fibroblastos dérmicos autógenos em matriz colágena com arranjo tridimensional e demonstraram a formação de uma estrutura semelhante ao tecido dérmico. O comportamento dos fibroblastos cultivados *in vitro* sobre matriz colágena com arranjo 3D assemelha-se ao de fibroblastos *in vivo* em relação à morfologia¹⁶⁴, síntese proteica¹³¹, expressão de enzimas^{165,166} e regulação do crescimento celular¹⁶⁷.

A escolha da MCS-3D, que constitui uma matriz dérmica acelular, como carreador de FGH partiu do princípio de essa matriz exibir um aspecto tridimensional propício para ser conduzido e implantado no hospedeiro. Além disso, a manutenção da arquitetura da derme durante o processo de preparação desse material facilitaria a penetração de células. A MCS-3D já demonstrou ter uma boa incorporação aos tecidos do hospedeiro *in vivo* e apresenta resultados clínicos favoráveis em procedimentos para aumento de tecido gengival^{17,19} e para recobrimento radicular^{20,22-24}. Alguns estudos foram realizados para avaliar a eficácia da MCS-3D como enxerto subepitelial, comparado ao ETCSE autógeno, com resultados similares entre as duas técnicas com relação tanto ao recobrimento radicular²⁰ como

a aumento da faixa de tecido queratinizado^{17,19}. No entanto estudos têm demonstrado que os enxertos autógenos resultam em menor tempo de cicatrização¹⁹. Assim, com a incorporação de células autógenas, poder-se-ia otimizar e reduzir o tempo de incorporação da MCS-3D, permitindo melhores resultados clínicos.

Além disso, a MCS-3D constitui uma membrana de dupla camada altamente purificada composta por colágeno tipo I e III. Esta estrutura colágena assemelha-se muito ao colágeno de origem humana, pois tanto os lipídios bem como proteínas e telopeptídios que podem resultar em reações imunológicas do hospedeiro são completamente removidos. O colágeno tipo I constitui a principal proteína estrutural presente nos tecidos além de fornecer força necessária aos tecidos para acomodar cargas mecânicas às quais os tecidos são comumente submetidos¹⁶⁹. O colágeno tipo III geralmente é encontrado no tecido submucoso, local no qual a flexibilidade tecidual é necessária para o cumprimento adequado das funções. Pelo fato da MCS-3D apresentar-se na forma purificada, não exhibe ligações cruzadas adicionais, fazendo assim com que a MEC xenógena não elucide reação de corpo estranho, evite a formação de cápsula fibrosa, degradação lenta ou completamente inibida e inflamação crônica, alterando dessa forma drasticamente a resposta de remodelação do organismo, o que torna essa matriz especialmente interessante¹⁷⁰.

No presente estudo, a morfologia e distribuição dos FGH demonstrou considerável diferença entre a matriz 2D e as matrizes 3D, entre as quais, essas características apresentaram bastante semelhança. Procurou-se ainda comparar a viabilidade e número de células presentes em amostras dos três diferentes grupos experimentais, além da proliferação celular e expressão de proteínas da MEC não colágena (fibronectina) e proteínas do citoesqueleto (tubulina e actina). A viabilidade celular foi superior no ColB-2D e na MCS-3D e significativamente inferior no ColB-3D, quando comparados a estas.

A cultura de fibroblastos em sistemas de monocamada representa um modelo valioso para o estudo de processos moleculares que organizam o tecido conjuntivo. No entanto, em tais culturas as células crescem até atingir confluência, condição esta não observada normalmente *in vivo*, uma vez que as células são restritas ao crescimento em carreadores 2D e não são circundadas por uma MEC morfológicamente organizada. Desta forma, o crescimento e atividade das células

nas culturas 2D diferem significativamente das situações *in vivo*. Os sistemas de cultura 3D têm sido desenvolvidos para mimetizar as interações naturais entre as células, portanto, equivalentes teciduais têm sido elaborados a fim de combinar as células e o arcabouço em sistemas de cultura 3D^{163,171,172}. O estudo da morfologia celular por epifluorescência demonstrou que em ambas as matrizes colágenas 3D os FGH tenderam a exibir um fenótipo mais cilíndrico ou fusiforme com menos projeções assim como menor área total de espraiamento celular do que na matriz 2D. Este formato assemelha-se ao fenótipo exibido por fibroblastos e células mesenquimais *in vivo*^{66,109,125}. Já na matriz de colágeno 2D os FGH exibiram forma menos alongada, mais ampla e achatada com maior quantidade de projeções e numerosas fibras de stress. Além disso, na avaliação de 7 dias os FGH apresentaram-se espraiados por praticamente toda a área da matriz. Estes resultados encontram-se de acordo com aqueles descritos anteriormente na literatura, em que uma série de estudos mostram que enquanto em uma cultura 2D, fibroblastos formam uma camada celular confluenta, sem variações na morfologia; em sistemas de cultura 3D essas células demonstram parar seu crescimento, e alguns dias após a cultura apresentam morfologia e distribuição espacial mais similar às células *in vivo*, mantendo seu formato estrelário, com apresentação polimórfica e interagindo entre si através de extensões citoplasmáticas, o que resulta na formação de espaços onde é depositada a MEC^{117,128,172,174}.

Hillmann *et al.*,¹⁷⁴ avaliando matrizes de colágeno sintéticas bioabsorvíveis, observaram que, em matrizes com fibras colágenas densamente organizadas, a migração celular é reduzida, enquanto que em membranas com arranjo mais frouxo, as células migram por todo o arcabouço. Resultado este corroborado por Rodrigues *et al.*⁹⁴ e Maia *et al.*⁹⁵, que observaram que a densa arquitetura de uma matriz colágena, de origem alógena, limitou a proliferação e migração celular para o interior de sua estrutura. Da mesma forma, nosso estudo revelou a presença de menor quantidade células na camada compacta da MCS-3D do que na camada menos densa. Provavelmente, as fibras colágenas da camada compacta da MCS-3D apresentam-se arranjadas de forma muito densa, constituindo um fator limitante para que ocorra uma distribuição celular homogênea. Por outro lado, na camada menos densa foi observada maior quantidade de células, que por sua vez estavam distribuídas de forma mais homogênea, devido ao fato de que a maior porosidade e

alta interconectividade dos poros nesta camada da MCS-3D facilitaram a difusão de nutrientes, viabilizando o crescimento das células *in vitro*. Esse achado nos parece bastante interessante, sob o ponto de vista da indicação do material como matriz para RTG, servindo, desta forma, a camada compacta como barreira para células indesejáveis ao processo, e a camada mais frouxa como arcabouço para os tipos celulares pertinentes ao processo de regeneração.

Em cultura de células, o aumento do número de células depende do estabelecimento de interações célula-célula, que limita a proliferação de fibroblastos e induz sua saída do ciclo celular¹⁷³. De fato, enquanto os fibroblastos cultivados sobre ColB-2D e ColB-3D demonstraram, no terceiro dia, estar em estado proliferativo, foi observada uma redução nesse estado em 7 dias em ambas as matrizes. No décimo dia, pode ser observado que as células cultivadas sobre ColB-3D pararam de proliferar enquanto aquelas cultivadas sobre ColB-2D ainda mantiveram certa proliferação. Esta observação está de acordo com os resultados de outros autores que encontraram que a proliferação de fibroblastos em matriz 3D é mais baixa do que em substratos rígidos de cultura 2D^{86,174}. As células cultivadas sobre a MCS-3D praticamente não demonstraram expressão do antígeno nuclear Ki-67, no entanto, acreditamos que estas células apresentam-se em estado proliferativo semelhante àquele observado pelos fibroblastos cultivados sobre a outra matriz 3D analisada nesse estudo, uma vez que demonstra viabilidade celular e expressão de proteínas. Acreditamos que tenha ocorrido alguma interação desfavorável entre o método utilizado para detectar a proliferação e algum constituinte da MCS-3D, assim como descrito anteriormente por outros autores¹⁷⁷.

Fibroblastos em arcabouços 3D demonstram profundas diferenças em sua capacidade proliferativa e biossintética em comparação as culturas 2D. Até um certo ponto estas diferenças podem ser conferidas à resposta modificada aos fatores de crescimento. Mas, obviamente são atribuídas às interações químicas e mecânicas específicas célula-matriz^{78,174-176}. Fibroblastos não se proliferam sob condições normais *in vivo*¹⁷⁴. Portanto, a baixa resposta proliferativa dos fibroblastos nos sistemas de cultivo 3D descritos aqui apresentam estimativa mais realista do comportamento dessas células *in vivo* do que em sistemas 2D.

O crescimento de fibroblastos gengivais para o interior das matrizes avaliadas neste trabalho foi analisado através da coloração de células viáveis por meio do

ensaio colorimétrico de MTT e pela produção de proteínas da MEC através da técnica de imunofluorescência indireta. A remodelação tecidual envolve destruição, síntese, contração e reorganização dos tecidos^{178,179}. As células são capazes de sentir estresses mecânicos (tensão), via integrinas, decorrentes das interações célula-célula e célula-matriz e reagir através de um padrão alterado de expressão de proteínas que conduz a uma MEC específica^{78,91}.

Assim, as propriedades do arcabouço são importantes para o objetivo funcional do tecido de engenharia tecidual desejado, pois podem afetar o crescimento celular, diferenciação e organização durante a formação tecidual¹⁸⁰. Uma série de trabalhos tem demonstrado que a rigidez da MEC desempenha grande impacto na diferenciação e função das células, em geral^{181,182}. Ela modula a ativação de proteínas de adesão, alterações do citoesqueleto de actina, locomoção e espraiamento dos fibroblastos¹⁸¹ e é suficiente para guiar especificações nas linhagens de células tronco¹⁸³.

O uso de microscopia confocal de varredura a laser oferece várias vantagens comparado à microscopia óptica convencional e microscopia eletrônica de varredura, uma vez que amostras úmidas e intactas podem ser examinadas por secções ópticas seriadas não invasivas. Além disso, imagens 3D das estruturas podem ser examinadas pelo uso de computadores para gerar pares estéreos. A microestrutura das matrizes de colágeno foi previamente investigada pelo uso de microscopia confocal de varredura^{174,184}. Nós concordamos com os autores, que a microscopia confocal é preferível para o estudo das interações celulares com materiais biomédicos.

Em cultura de células 2D, está bem estabelecido que o citoesqueleto de actina apresenta importante papel na morfologia e migração tecidual, assim como na ligação da célula a MEC, através de adesões celulares^{185,186}. Contudo, *in vivo* fibroblastos apresentam poucas fibras de stress actínicas^{187,188} exceto em tecidos constantemente submetidos a elevada carga mecânica¹⁸⁸. Nós observamos similar escassez de fibras de estresse nas matrizes colágenas 3D, nas quais apenas poucas e delicadas fibras foram observadas menos intensamente marcadas. Assim os fenótipos das fibras de actina em matrizes 3D são muito mais similares às células

in vivo do que as células em substratos 2D revestidos. A observação de que numerosas fibras de estresse abrangendo as células em ColB-2D neste estudo é consistente com altos níveis de estresse presente no citoesqueleto associado com substratos rígidos, não complacentes que promovem a formação de adesões focais e fibras de estresse^{128,182,189,190}. A polimerização de fibrilas de fibronectina controla a deposição e estabilidade de outras moléculas da MEC como o colágeno tipo I e II, bem como locais de adesão célula-matriz. Além disso, a fibronectina é envolvida no controle da cascata de sinalização da MEC que regula muitos aspectos do comportamento celular^{191,192}. A formação de fibronectina na matriz é necessária para a ativação da RhoA GTPase, um importante iniciador de um sinal de transdução envolvido na proliferação celular e reorganização do citoesqueleto¹⁹³. A expressão de fibronectina por célula evidenciou ser igual tanto nas matrizes 3D quanto na matriz 2D com relação a sua quantificação. Na matriz 2D os fibroblastos depositaram elaborada rede de fibronectina demonstrando intensa atividade remodeladora. Contudo, nas matrizes 3D os depósitos pareceram dotados de fibrilas curtas e em pouca quantidade. Demonstrando a influência da elasticidade das matrizes na deposição e remodelação da MEC, parecendo esta mais elaborada no substrato 2D, que por sua vez demonstra rigidez superior, do que nas matrizes 3D. Este achado é consistente com os achados de Mauch *et al.*⁸⁷ e com a avaliação *in vitro* realizada por Mathes *et al.*¹⁵⁴ no mesmo tipo de MCS-3D utilizada em nosso trabalho, que demonstrou o crescimento de fibroblastos no interior da MCS-3D, resultando na expressão aumentada de fibronectina na MCS-3D somente quando cultivada com estímulo mecânico em biorreator e perfusão com meio de cultura.

A síntese reduzida de proteínas não colágenas claramente demonstra que o crescimento de fibroblastos em matrizes de colágeno 3D tem muitos efeitos em sua atividade biosintética. Níveis estáveis de tubulina sugerem que a redução da síntese de colágeno não reflete na depressão geral da atividade celular, mas assemelha-se a uma reprogramação de funções selecionadas. A preservação dos níveis de tubulina em ColB-2D no ColB-3D e MCS-3D encontradas nesse trabalho são suportadas pelas observações de Mauch *et al.*^{86,87} e Unemori & Werb¹⁹⁴ que encontraram a equivalência de expressão de tubulina tanto no substrato 2D quanto

nas matrizes 3D e que a morfologia celular em matrizes de colágeno dependem, em grande parte, da organização dos microtúbulos.

Outro dado importante observado foi a grande variação entre as amostras, indicado pelo alto desvio padrão tanto nos experimentos de morfologia e contagem, quanto nos experimentos de viabilidade. Essa variação se deve, em parte, a diferenças resultantes de características específicas de cada indivíduo, já que os dados representam a média dos resultados obtidos no cultivo de células de 3 indivíduos diferentes.

Esses resultados são promissores, e motivam a utilização de técnicas mais renomadas de quantificação de proteínas para maior confiabilidade dos resultados por nós obtidos, e posterior emprego desta matriz com FGH, produto de engenharia tecidual, em modelo animal para avaliação de seu comportamento *in vivo*.

CONCLUSÃO

---

7. CONCLUSÃO

O presente estudo nos permite concluir que a matriz colágena de origem suína constitui uma matriz 3D adequada para o cultivo de fibroblastos gengivais humanos, uma vez que, no interior da matriz, importantes propriedades foram verificadas, dentre as quais, morfologia, e expressão de proteínas, semelhantes a uma matriz colágena tridimensional já consagrada na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reddy MS. Achieving gingival esthetics. *J Am Dent Assoc* 2003;134(3):295-304.
2. Zucchelli G, Sanctis MD. Long-term outcome following treatment of multiple Miller class I and II recession defects in esthetic areas of the mouth. *J Periodontol* 2005;76(2):2286-2292.
3. Borguetti A, Louise F. Controlled clinical evaluation of the subpedicle connective tissue graft for the coverage of gingival recession. *J Periodontol* 1994;65(12):1107-1112.
4. Griffin TJ, Cheung WS, Zavras AI, Damoulis PD. Post-operative complications following gingival augmentation procedures. *J Periodontol* 2006;77(12):2070-2079.
5. Wessel JR, Tatakis DM. Patient outcomes following subepithelial connective tissue graft and free gingival graft procedures. *J Periodontol* 2008;79(3):425-430.
6. Dodge JR, Henderson R, Greenwell H. Root coverage without a palatal donor site, using an acellular dermal graft. *Periodontal Insights* 1998; 5:5-9.
7. Soileau KM, Brannon RB. A histologic evaluation of various stages of palatal healing following subepithelial connective tissue grafting procedures: a comparison of eight cases. *J Periodontol* 2006;77(7):1267–1273.
8. Callan DP. Use of acellular dermal matrix allograft material in dental implant treatment. *Dent Surg Products* 1996;9:14-17.
9. Silverstein LH, Callan DP. An acellular dermal matrix allograft substitute for palatal donor tissue. *Postgrad Dent* 1996;3:14-21.
10. Batista EL Jr, Batista FC, Novaes AB Jr. Management of soft tissue ridge deformities with acellular dermal matrix: Clinical approach and outcome after 6 months. *J Periodontol* 2001;72(2):265-273.
11. Harris RJ. Root coverage with a connective tissue with partial thickness double pedicle graft and an acellular dermal matrix: A clinical and histological evaluation of a case report. *J Periodontol* 1998; 69(11):1305-1311.

12. Aichelmann-Reidy ME, Yukuna RA, Evans GH, Mayer ET. Clinical evaluation of acellular allografts dermis for the treatment of human gingival recession. *J Periodontol* 2001;72(8):998-1005.

13. Novae AB Jr, Grisi DC, Molina GO, Souza SLS, Taba M Jr, Grisi MFM. Comparative 6-month clinical study of a subepithelial connective tissue graft and acellular dermal matrix graft for the treatment of gingival recession. *J Periodontol* 2001; 72(11):1477-1484.

14. Barros RR, Novaes AB, Grisi MF, Souza SL, Taba MJ, Palioto DB A 6-month comparative clinical study of a conventional and a new surgical approach for root coverage with acellular dermal matrix. *J Periodontol* 2004; 75(10):1350-1356.

15. Hämmerle C, Karring T. Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontol 2000* 1998;17:151–175.

16. Wallace SS, Froum SJ. Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8(1):328-43.

17. Sanz M, Lorenzo R, Aranda JJ, Martin C, Orsini M. Clinical evaluation of a new collagen matrix (Mucograft prototype) to enhance the width of keratinized tissue in patients with fixed prosthetic restorations: a randomized prospective clinical trial. *J Clin Periodontol* 2009;36(10):868–876.

18. Jung RE, Hürzeler MB, Thoma DS, Khraisat A, Hämmerle CHF. Local tolerance and efficiency of two prototype collagen matrices to increase the width of keratinized tissue. *J Clin Periodontol* 2011; 38(2):173-179.

19. Nevins M, Nevins ML, Kim SW, Schupbach P, Kim DM. The use of mucograft collagen matrix to augment the zone of keratinized tissue around teeth: a pilot study 2011;31(4):367-73.

20. McGuire MK, Scheyer ET. Xenogenic collagen matrix with coronally advanced flap compared to connective tissue with coronally advanced flap for the treatment of dehiscence-type recession defects. *J Periodontol* 2010;81(8):1108-1117.

21. Vignoletti F, Nuñez J, Discepoli N, De Sanctis F, Caffesse R, Muñoz F, Lopez M, Sanz M. Clinical and histological healing of a new collagen matrix in combination with the coronally advanced flap for the treatment of Miller class-I recession defects: an experimental study in the minipig. *J Clin Periodontol* 2011;38(9):847-55.

22. Reino DM, Novaes AB Jr, Fernandes PG, Maia LP. Uso do Mucograft no tratamento de retração gengival. *Rev Dental Press Implantol* 2011;5(2):74-82.
23. Reino DM, Maia LP, Fernandes PG, Novaes AB Jr. Tratamento de retração gengival através da técnica de retalho estendido associado ao uso de mucograft. *Periodontia* 2012;6(2):146-51.
24. Camelo M, Nevins M, Nevins ML, Schupbach P, Kim DM. Treatment of gingival recession defects with xenogenic collagen matrix: a histologic report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2012;32(2):167-173.
25. Janson WA, Ruben MP, Kramer GM, Bloom AA, Turner H. Development of the blood supply to split-thickness free gingival autografts. *J Periodontol* 1969;40(12):707-716.
26. Srivastava A, Jennings LJ, Hanumadass M, Sethi S, DeSagun E, Pavlis N, Reyes HM, Walter RJ. Xenogeneic acellular dermal matrix as a dermal substitute in rats. *J Burn Care Rehabi.* 1999 Sep-Oct;20(5):382-90.
27. Srivastava A, DeSagun EZ, Jennings LJ, Sethi S, Phuangsab A, Hanumadass M, Reyes HM, Walter RJ. Use of porcine acellular dermal matrix as a dermal substitute in rats. *Ann Surg* 2001;233(3):400-8.
28. Erdag G, Sheridan RL. Fibroblasts improve performance of cultured composite skin substitutes on athymic mice. *Burns* 2004;30(4):322-328.
29. Gottlow J, Nyman S, Karring T. Healing following citric acid conditioning of roots implanted into bone and gingival connective tissue. *J Periodont Res* 1984;19(2):214-220.
30. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260(5110):920-6.
31. Taba M Jr, Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV. Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod Craniofac Res* 2005;8(4):292-302.
32. Slavkin HC, Bartold PM. Challenges and potential in tissue engineering. *Periodontol* 2000 2006;41:9–15.

33. Izumi Y, Aoki A, Yamada Y, Kobayashi H, Iwata T, Akizuki T, Suda T, Nakamura S, Wara-Aswapati N, Ueda M, Ishikawa I. Current and future periodontal tissue engineering. *Periodontology* 2000 2011;56(1):166–187.
34. Novaes AB Jr, Marchesan JT, Macedo GO, Palioto DB. Effect of in vitro gingival fibroblast seeding on the in vivo incorporation of acellular dermal matrix allografts in dogs. *J Periodontol* 2007;78(2):296-303.
35. Chevallay B, Herbage D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: Applications for tissue engineering and gene therapy. *Med Biol Comput* 2000;38(2):211-8.
36. Blumenthal NM, Koh-Kunst G, Alves ME, Miranda D, Sorensen RG, Wozney JM, Wikesjo UM. Effect of surgical implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a bioabsorbable collagen sponge or calcium phosphate putty carrier in intrabony periodontal defects in the baboon. *J Periodontol* 2002;73(12):1494-1506.
37. Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, Inoue M, Shigeno K, Tabata Y, Eto K, Shimizu Y. Novel approach to regeneration of periodontal tissues based on in situ tissue engineering: effects of controlled release of basic fibroblast growth factor from a sandwich membrane. *Tissue Eng* 2003;9(1):153-162.
38. Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14(2):199-215.
39. Hall, H. Modified fibrin hydrogel matrices: both, 3D- scaffolds and local and controlled release systems to stimulate angiogenesis. *Curr Pharm Des* 2007; 13(35):3597-3607.
40. Demarchez M, Hartmann DJ, Regnier M, Asseilneau D. The role of fibroblasts in dermal vascularization and remodeling of reconstructed human skin after transplantation onto the nude mouse. *Transplantation* 1992;54(2):317-326.
41. Okamoto E, Kitano Y. Expression of basement membrane components in skin equivalents – Influence of dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci* 1993;5(2):81-88.
42. Naughton G, Mansbridge J, Gentzkow G. A metabolically active human dermal replacement for the treatment of diabetic foot ulcers *Artif Organs* 1997;21(11):1203-1210.

43. Izumi K, Feinberg SE, Lida A, Yoshizawa M. Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: a preliminary report. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;32(2):188-197.
44. Yamada K, Yamura J, Katoh M, Hata K, Okuda K, Yoshie H. Fabrication of cultured oral gingival by tissue engineering techniques without materials of animal origin. *J Periodontol* 2006;77(4):672-677.
45. Jhaveri HM, Chavan MS, Tomar GB, Deshmukh VL, Wani MR, Miller PD Jr. Acellular dermal matrix seeded with autologous gingival fibroblasts for the treatment of gingival recession – a proof of concept study. *J Periodontol* 2010;81(4):616-625.
46. Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 1998;16(5):224-30.
47. Vacanti JP, Langer R, Upton J, Marler JJ. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;33(1-2):165-182.
48. Hillmann G, Steinkamp-Zucht A, Geurtsen W, Gross G, Hoffmann A. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. *Biomaterials* 2002;23(6):1461-1469.
49. Kasaj A, Reichert C, Götz H, Röhrig B, Smeets R, Willershausen B. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. *Head Face Med* 2008;4(22):1-8.
50. Sipe JD, Kelley CA, McNichol LA. Tissue engineering and reparative medicine. *Ann NY Acad Sci* 2002;961:1-9.
51. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 2009;324(5935):1673-1677.
52. Rios HF, Lin Z, Oh B, Park CH, Giannobile WV. Cell- and gene-based therapeutic strategies for periodontal regenerative medicine. *J Periodontol* 2011;82(9):1223-1237.
53. Lavik E, Langer R. Tissue engineering: currents state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;65(1):1-8.

54. Nakahara T. A review of new developments in tissue engineering therapy for periodontitis. *Dent Clin Nirth Am* 2006;50(2):265-76.
55. Marler JJ, Upton J, Langer R, Vacanti JP. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;33:165-182.
56. Chen FM, Jin Y. Periodontal Tissue Engineering and Regeneration: Current approaches and Expanding Opportunities. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16(2):219-246.
57. Bartold PM, Xiao Y, Lyngstaadas SP, Paine ML, Snead ML. Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration. *Periodontol 2000* 2006;41:123-135.
58. Peppas, N.A. & Langer, R. New challenges in biomaterials. *Science* 1994;263(5154):1715–1720.
59. Hubbell, J.A. Biomaterials in tissue engineering. *BioTechnology* 1995;13(6):565–576.
60. Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature* 2004; 428(6982):487–492.
61. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. An Introduction to Materials in Medicine. *Biomaterials Science* 2004;6:41-75.
62. Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. Three-dimensional matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14(1):61-68.
63. Hynes RO. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol* 1999;9(12):33-77.
64. Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14(5):633-9.
65. West ER, Xu M, Woodruff TK, Shea LD. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on in vitro follicle development. *Biomaterials* 2007;28(3):4439-4448.

66. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 2001;294(5547):1708-1712.
67. Roskelley CD, Desprez PY, Bissell MJ. Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(26):12378-12382.
68. Streuli CH, Bailey N, Bissell MJ. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *J Cell Biol* 1991;115(5):1383-1395.
69. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(10):839-845.
70. Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* 2007;130(4):601-610.
71. Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng* 2009;110(4):655-63.
72. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* 2005;1(23):47-55.
73. Li S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *J Biomed Mater Res* 1999;48(3): 342-353.
74. Williams RL, Doherty PJ. A preliminary assessment of poly(pyrrole) in nerve guide studies. *J Mater Sci Mater Med* 1994;5(6/7):429-433.
75. Srisuwan T, Tilkorn DJ, Wilson JL, Morrison WA, Messer HM, Thompson EW, Abberton KM. Molecular aspects of tissue engineering in the dental field. *Periodontol* 2000 2006;41:88-108.
76. Weiss P. Cellular dynamics. *Rev Mod Phys* 1959;31:11-20.
77. Elsdale T, Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol* 1972;54(3):626-637.

78. Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol* 2003;13(5):264–269.
79. Rhee S. Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. *Exp Mol Med*. 2009;41(12):858-865.
80. Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol* 1994; 124(4):401–404.
81. Wakatsuki T, Kolodney MS, Zahalak GI, Elson EL. Cell mechanics studied by a reconstituted model tissue. *Biophys J* 2000; 79(5):2353–2368.
82. Silver FH, Siperko LM, Seehra GP. Mechanobiology of force transduction in dermal tissue. *Skin Res Technol* 2003;9(1):3–23.
83. Marsano A, Maidhof R, Wan LQ, Wang Y, Gao J, Tandon N, Vunjak-Novakovic G. Scaffold stiffness affects the contractile function of three-dimensional engineered cardiac constructs. *Biotechnology Progress* 2010;26(5):1382-1390.
84. Kelly GM, Kilpatrick JI, van Es MH, Weafer PP, Patrick J. Prendergast, Suzanne P. Jarvis. Bone cell elasticity and morphology changes during the cell cycle. *Journal of Biomechanics* 2011;44(8):1484-1490.
85. Drexler JW, Powell HM. 2011. Regulation of electrospun scaffold stiffness via coaxial core diameter. *Acta Biomaterialia* 2011;7(3):1133-1139.
86. Mauch C, Hatamochi A, Scharffetter K, Krieg T. Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three-dimensional collagen gel. *Exp Cell Res* 1988;178(2):493-503.
- 87 Mauch C, Adelman-Grill B, Hatamochi A, Krieg T. Collagenase gene expression in fibroblasts is regulated by a three-dimensional contact with collagen. *FEBS Lett* 1989; 250(2):301-5.
88. Hatamochi A, Aumailley M, Mauch C, Chu ML, Timpl R, Krieg T. Regulation of collagen VI expression in fibroblasts. Effects of cell density, cell-matrix interactions, and chemical transformation. *J Biol Chem* 1989;264(6):3494-9.

89. Eckes B, Mauch C, Hüppe G, Krieg T. Differential regulation of transcription and transcript stability of pro-alpha 1(I) collagen and fibronectin in activated fibroblasts derived from patients with systemic scleroderma. *Biochem J* 1996;15(315):549-54.
90. Pelham RJ, Wang YL. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Sci USA* 1997;94(25):13661-13665.
91. Chiquet M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol* 1999;18(5):417-426.
92. Ojeh NO, Frame JD, Navsaria HA. In vitro characterization of an artificial dermal scaffold. *Tissue Eng* 2001;7(4):457-472.
93. Moscato S, Mattii L, D'Alessandro D, et al. Interaction of human gingival fibroblasts with PVA/gelatin sponges. *Micron* 2008;39(5):569-579.
94. Rodrigues AZ, Oliveira PT, Novaes Jr AB, Maia LP, Souza SLS, Palioto DB. Evaluation of *In Vitro* Human Gingival Fibroblast Seeding on Acellular Dermal Matrix. *Braz Dent J* 2010;21(3):179-185.
95. Maia LP, Novaes Jr AB, Souza SLS, Grisi MFM, Taba Jr M, Palioto DB. In Vitro Evaluation of Acellular Dermal Matrix as a Three-Dimensional Scaffold for Gingival Fibroblasts Seeding. *J Periodontol* 2011;82(2):293-301.
96. Vasita, R., and Katti, D.S. Growth factor-delivery systems for tissue engineering: a materials perspective. *Expert Rev Med Devices* 2006;3(1):29-47.
97. Jarman-Smith ML, Mcfetridge P, Chaudhuri JB. Collagen-derived matrices for tissue engineering. *Eur Cells and Mat* 2002;4:18.
98. Harkness RD. Biological functions of collagen. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1961;36:399-463.
99. Chapman JA, Tzaphlidou M, Meek KM, Kadler KE. The collagen fibril – a model system studying the staining and fixation of a protein. *Electron Microsc Rev* 1990;3(1):143-182.

100. Lynch MP, Stein JL, Stein GS, Lian JB. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvaria osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res* 1995;216(1):35-45.
101. Delustro F, Dasch J, Keefe J, Ellingsworth L. Immune responses to allogenic and xenogenic implants of collagen and collagen derivatives. *Clin Orthop*. 1990;260:263-79.
102. Valente M, Ius P, Bortolotti U, Talenti E, Bottio T, Thiene G. Pathology of Pericarbon bovine pericardial xenograft implanted in humans. *J Heart Valve Dis* 1998;7(2):180-9.
103. Nöth U, Rackwitz L, Heymer A, Weber M, Baumann B, Steinert A, Schütze N, Jakob F, Eulert J. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in a collagen type I hydrogel for articular cartilage repair. *J Biomed Mat Res A* 2007;83(3):623-635.
104. Steinberg BM; Smith K; Colozzo M; Pollack R. Establishment and transformation diminish the ability of fibroblasts to contract a native collagen gel. *J Cell Biol* 1980;87(1):304-8.
105. Schmitt B, Ringe J, Haupl T, Notter M, Manz R, Burmester GR, Sittinger M, Kaps C. BMP-2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. *Differentiation* 2003;71(9-10):567-77.
106. Lewus KE; Nauman EA. In vitro characterization of a bone marrow stem cell-seeded collagen gel composite for soft tissue grafts: effects of fiber number and serum concentration. *Tissue engineering* 2005;11(7-8):1015-22.
107. Jiang H, Grinnell F. Cell-matrix entanglement and mechanical anchorage of fibroblasts in three-dimensional collagen matrices. *Mol Biol Cell*. 2005;16(11):5070-6.
108. Grinnell F. Fibroblast mechanics in three-dimensional collagen matrices. *J Bodyw Mov Ther* 2008 Jul;12(3):191-3.
109. Beningo KA, Dembo M, Wang YL. Responses of fibroblasts to anchorage of dorsal extracellular matrix receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(52):18024-18029.

110. Carlson MA, Longaker MT. The fibroblast-populated collagen matrix as a model of wound healing: a review of the evidence. *Wound Repair Regen* 2002;12:134-147.
111. Giannone G, Sheetz MP. Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways. *Trends Cell Biol* 2006;16(4): 213-223.
112. Roeder BA, Kokini K, Sturgis JE, Robinson JP, Voytik-Harbin SL, Roeder. Tensile mechanical properties of three-dimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure. *J Biomech Eng* 2002;124(2):214-222.
113. Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* 1981;211(4486):1052-1054.
114. Eckes B, Kessler D, Aumailley M, Krieg T. Interactions of fibroblasts with the extracellular matrix: implications for the understanding of fibrosis. *Springer Semin Immunopathol* 1999;21(4):415-429.
115. Kessler D, Dethlefsen S, Haase I, Plomann M, Hirche F, Krieg T, Eckes B. Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a 'synthetic' phenotype. *J Biol Chem* 2001;276(39):36575-36585.
116. Tian B, Lessan K, Kahm J, Kleidon J, Henke C. Beta 1 integrin regulates fibroblast viability during collagen matrix contraction through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/protein kinase B signaling pathway. *J Biol Chem* 2002;277(27):24667-24675.
117. Rhee S, Grinnell F. Fibroblast mechanics in 3D collagen matrices. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59(13):1299-1305.
118. Gauthier NC, Rossier OM, Mathur A, Hone JC, Sheetz MP. Plasma membrane area increases with spread area by exocytosis of a GPI Anchored Protein. *Mol Biol Cell* 2009;20(14):3261-72.
119. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993;165(6):728-37.
120. Rennekampff HO, Kiessig V, Hansbrough JF. Current concepts in the development of cultured skin replacements. *J Surg Res* 1996;62(2):288-295.

121. Izumi K, Song J, Feinberg SE. Development of a tissue-engineered human oral mucosa: from the bench to the bed side. *Cells Tissues Organs* 2004;176(1-3):134-152.
122. Rouabhia M, Allaire P. Gingival mucosa regeneration in athymic mice using in vitro engineered human oral mucosa. *Biomaterials* 2010;31(22): 5798-5804.
123. Amatangelo MD, Bassi DE, Klein-Szanto AJ, Cukierman E, Stroma-derived three-dimensional matrices are necessary and sufficient to promote desmoplastic differentiation of normal fibroblasts. *Am J Pathol* 2005;167(2):475-88.
124. Walpita D, Hay E. Studying actin dependent processes in tissue culture. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:137–141.
125. Friedl P, Brocker EB. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 2000;57(1):41-64.
126. Friedl P. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16(1):14-23.
127. Zaman MH, Trapani LM, Sieminski AL, Mackellar D, Gong H, Kamm RD, Wells A, Lauffenburger DA, Matsudaira P. Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(29):10889-94.
128. Hakkinen KM, Harunaga JS, Doyle AD, Yamada KM. Direct Comparisons of the Morphology, Migration, Cell Adhesions, and Actin Cytoskeleton of Fibroblasts in Four Different Three-Dimensional Extracellular Matrices. *Tissue Eng Part A* 2011;17(5-6):13-14.
129. Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Friedl P. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol*, 2003;160(2): 267-277.
130. Friedl P, Wolf K. Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28(1):129–35.
131. Nusgens B, Merrill C, Lapiere C, Bell E. Collagen biosynthesis by cells in a tissue equivalent matrix in vitro. *Collagen Relat Res.* 1984;4(5):351-364.

132. Nishiyama T, Tsunenaga M, Nakayama Y, Adachi E, Hayashi T. Growth rate of human fibroblasts is repressed by the culture within reconstituted collagen matrix but not by the culture on the matrix. *Matrix* 1989;9(3):193-9

133. Kono T, Tanii T, Furukawa M, Mizuno N, Kitajima J, Ishii M, Hamada T, Yoshizato K. Parallel arrangement, growth inhibition and cell cycle phase analysis of human dermal fibroblasts cultured in collagen lattice. *J Dermatol* 1990;17(1):2-10.

134. Nakagawa S, Pawelek P, Grinnell F. Long-term culture of fibroblasts in contracted collagen gels: effects on cell growth and biosynthetic activity. *J Invest Dermatol* 1989;93(6):792-8.

135. Doillon CJ, Hembry RM, Ehrlich HP, Burke JF. Actin filaments in normal dermis and during wound healing. *Am J Pathol* 1987;126:164-70.

136. Thie M, Schlumberger W, Rauterberg J, Robenek H. Mechanical confinement inhibits collagen synthesis in gel-cultured fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 1989;48(2):294-302.

137. Scharffetter K, Kulozik M, Stolz W, Lankat-Buttgereit B, Hatamochi A, Söhnchen R, Krieg T. Localization of collagen alpha 1(I) gene expression during wound healing by in situ hybridization. *J Invest Dermatol* 1989;93(3):405-12.

138. Becker D. Temporary wound dressing of burns with fresh, sterile. Frozen porcine skin. *Ann Burn Fire Disasters* 1998;11:171-175.

139. Chiu T, Burd A. Xenograft dressing in the treatment of burns. *Clin Dermatol* 2005;23(4):419-23.

140. Adedeji OA, Bailey CA, Varma JS. Porcine dermal collagen graft in abdominal wall reconstruction. *BR J Plast Surg* 2002;55:85-86.

141. Matoukovál E, Stehlík P, Veselyl P. Acellular porcine xenodermis as a temporary wound cover and substratum for cultured keratinocytes. *Eur Cells Mat* 2002;4:83-85.

142. Jarman-Smith ML, Mcfetridge P, Chaudhuri JB. Collagen-derived matrices for tissue engineering. *Eur Cells and Mat* 2002;4:18-25.

143. Hämmerle CH, Jung RE. Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontol 2000*. 2003;33:36–53.
144. Jung RE, Siegenthaler DW, Hammerle CH. Postextraction tissue management: a soft tissue punch technique. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2004;24(6):545-53.
145. Hämmerle CH, Karring T. Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontol 2000* 1998;17:151–175.
146. Kimble KM, Eber RM, Soehren S, Shyr Y, Wang HL. Treatment of gingival recession using a collagen membrane with or without the use of demineralized freeze-dried bone allograft for space maintenance. *J Periodontol* 2004;75:210–220.
147. Jesty J, Wieland M, Niemiec J. Assessment in vitro of the active hemostatic properties of wound dressings. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;89:536–542.
148. Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:369–378.
149. Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Sager M, Becker J. Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: an immunohistochemical study in the rat. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:403–409.
150. Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Wustefeld M, Sager M, Ferrari D, Becker J. Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence type defect using different barrier membranes: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:402–415.
151. Reino DM, Ayub LG, Ramos UD, Novaes Jr AB. Use of soft tissue substitutes in dentistry. *Braz J Periodontol* 2011;21(4):39-45.
152. Mucograft FDA-approved package. Wolhousen, Switzerland: Geistlich Pharma.
153. Herford AS, Akin Lee, Cicciu M, Maiorana C, Boyne PJ. Use of a porcine collagen matrix as an alternative to autogenous tissue for grafting oral soft tissue defects. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:2464-1470.

154. Mathes SH, Wohlwend L, Uebersax L, Von Mentlen R, Thoma DS, Jung RE, Görlach C, Graf-Hausner U. A Biorreactor Test System to Mimic the Biological and Mechanical Environment of Oral Soft Tissues and to Evaluate Substitutes for Connective Tissue Grafts. *Biotechnol Bioeng* 2010;107(6):1029-39.
155. Thoma DS, Jung RE, Schneider D, Cochran DL, Ender A, Jones AA, Görlach C, Uebersax L, Graf-Hausner U, Hämmerle CHF. Soft tissue volume augmentation by the use of collagen-based matrices: a volumetric analysis. *J Clin Peridontol* 2010;37: 659–666.
156. Mandelaris GA, Lu M, Rosenfeld AL. The use of a xenogenic collagen matrix as interpositional soft-tissue graft to enhance peri-implant soft-tissue outcomes: A clinical case report and histologic analysis. *Clin Adv Periodontics* 2011;1:193-198.
157. Somerman MJ, Archer SY, Imm GM, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts *in vitro*. *J Dent Res* 1988;67(1):66-70.
158. De Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 2004;25(3):403-413.
159. De Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of *in vitro* osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res A* 2007;80(3):554-564.
160. Schwartz Fo HO, Novaes AB Jr, de Castro LMS, Rosa AL, de Oliveira PT. *In vitro* osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron scale topography. *Clin Oral Implants Res* 2007;18(3):333-344.
161. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182(3):311-322.
162. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1-2):55-63.
163. Bell E, Ivarson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci* 1979;76(3):1274-1278.

164. Bell E, Sher S, Hull B, Merrill C, Rosen S, Chamson A, Asselineau D, Dubertret L, Coulomb B, Lapiere C, Nusgens B, Neveux Y. The reconstruction of a living skin. *J Invest Dermatol* 1983;81:2-10.
165. Coulomb B, Dubertret L, Bell E, Merrill C, Fosse M, Breton-Gorius J, Prost C, Touraine ER. Endogenous peroxidases in normal human dermis: a marker of fibroblasts differentiation. *J Invest Dermatol* 1983;81:75-78.
166. Colige AC, Lambert CA, Nusgens BV, Lapière CM. Effect of cell-cell and cell-matrix interactions on the response of fibroblasts to epidermal growth factor in vitro. *Biochem J* 1992;285:215-221.
167. Sarber R, Hull B, Merrill C, Soranno T, Bell E. Regulation of proliferation on fibroblasts of low and high population doubling levels grown in collagen lattices. *Mech Ageing Dev* 1981;17:107-117.
168. Barnard EK, Gathercole LJ. Short and long range order in basement membrane type IV collagen revealed by enzymatic and chemical extraction. *Int J Biol Macromol* 1991;13(6):359–365.
169. Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant Immunology* 2004;12:367-377.
170. Grinnell, F. and Lamke, R. Reorganization of hydrated collagen lattices by human skin fibroblasts. *J Cell Sci* 1984;66:51-53.
171. Guidry C, Grinnell F. Studies on the mechanism of hydrated collagen gel reorganization by human skin fibroblasts. *J Cell Sci* 1985;79:67-81.
172. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:349–63.
173. Holley RW. Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature* 1975;11:487-490.

174. Hillmann G, Gebert A, Geurtsen W. Matrix expression and proliferation of primary gingival fibroblasts in a three-dimensional cell culture model. *J Cell Sci* 1999; 112:2823-2832.
175. Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *Cell Biol* 1994;124:401-404.
176. Eckes B, Krieg T, Nusgens BV, Lapiere CM. In vitro reconstituted skin as a tool for biology, pharmacology and therapy: a review. *Wound Rep Reg* 1995;3:248-257.
177. Schor SL. Cell proliferation and migration on collagen substrat *in vitro J Cell Sci* 1980;41:159-175.
178. Koopmann CJ. Cutaneous wound healin. An overview. *Otolaryngol Clin North Am* 1995;28(5):835-845.
179. Schultze-Mosgau S, Blatz M, Wehrham F, Schlegel K, Thorwart M, Holst S. Principles and mechanisms of peri-implant soft tissue healing. *Quintessence* 2005;36(10):759-769.
180. Ingber, D.E. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J* 2006;20(7):811-827.
181. Pelham, R.J., Jr., and Wang, Y. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(25):13661-13665.
182. Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 2005; 310(5751):1139-1143.
183. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006;126(4):677-689.
184. Hanthamrongwit M, Grant MH, Wilkinson R. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) for the study of collagen sponge microstructure. *J Biomed Mat Res* 1994;28:213-216.
185. Le Clainche C, Carlier MF. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev* 2008;88(2):489-513.

186. Gardel ML, Schneider IC, Aratyn-Schaus Y, Waterman C. Integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010;26:315.

187. Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14(5):538-546.

188. Ralphs JR, Waggett AD, Benjamin M. Actin stress fibres and cell-cell adhesion molecules in tendons: organisation *in vivo* and response to mechanical loading of tendon cells in vitro. *Matrix Biol* 2002;21(1):67-74.

189. Bershadsky AD, Balaban NQ, Geiger B. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003;19:677-95.

190. Dubash AD, Menold MM, Samson T, Boulter E, Garcia-Mata R, Doughman R, Burridge K. Chapter 1. Focal adhesions: new angles on an old structure. *Int Rev Cell Mol Biol* 2009; 277:1-65.

191. Sottile J, Hocking DC. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell–matrix adhesions. *Mol Biol Cell* 2002;13:3546–3559.

192. Velling T, Risteli J, Wennerberg K, Mosher DF, Johansson S. Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins $\alpha 11\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$. *J Biol Chem* 2002;277(40), 37377– 37381.

193. Bourdoulous S, Orend G, MacKenna DA, Pasqualini R, Ruoslahti E. Fibronectin matrix regulates activation of RHO and CDC42 GTPases and cell cycle progression. *J Cell Biol* 1998;143(1):267–276.

194. Unemore EN, Werb Z. Reorganization of polymerized actin: a possible trigger for induction of procollagenase in fibroblasts cultured in and on collagen gels. *J Cell biology* 1996;103:1021-1031.

APÊNDICE

APÊNDICE

Apêndice A – Artigo em Inglês

In vitro evaluation of porcine collagen matrix as a three-dimensional scaffold for gingival fibroblasts seeding.

Carolina de Moraes Rego Mandetta* DDS; Luciana Prado Maia* DDS, MSc; Arthur B. Novaes Jr* DDS, PhD; Sérgio Scombatti de Souza* DDS, PhD; Márcio Fernando de Moraes Grisi * DDS, PhD; Mário Taba Júnior *DDS, PhD; Daniela Bazan Palioto* DDS, PhD.

*Department of Buccomaxillofacial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil.

Correspondence: Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto, Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Av. do Café s/n, 14040-904 Ribeirão Preto, SP, Brasil. Fax: +55-16-3633-0999. e-mail: dpalioto@forp.usp.br

Support: State of São Paulo Research Foundation, São Paulo, SP, Brazil (grant 2006/03063-0 to Dr. Palioto).

Number of figures and tables: 4

Running title: **Evaluation of porcine collagen matrix as a 3D scaffold.**

Summary: Gingival fibroblasts located the interior of PCM-3D demonstrating a three-dimensional arrangement and protein expression.

ABSTRACT

Background: The aim of this investigation was to verify if PCM-3D is a suitable three-dimensional matrix, through its *in vitro* response to gingival fibroblasts. **Methods:** Human gingival fibroblasts (HGF) culture was established by the explant technique of gingival connective tissues of three healthy patients. HGF were seeded on bidimensional bovine collagen matrix (BCol-2D), three-dimensional bovine collagen matrix (BCol-3D) and three-dimensional porcine collagen matrix (PCM-3D). HGF were grown for up to 10 days. At 3, 7 and 10 days the following parameters were assessed: HGF number, morphology and distribution by direct fluorescence; cell viability by MTT; cell proliferation and expression of

proteins of the extracellular matrix non-collagenous – fibronectina and cytoskeletal proteins – actin and tubulin by indirect immunofluorescence. Quantitative data were submitted to Friedman and Kruskal-Wallis test, and the last one was followed by Tukey's test. **Results:** Epifluorescence revealed that HGF grown on BCol-2D were broader, more flattened and had more cell protrusions and stress fibers in all experimental times. On the other hand, HGFs seeded on BCol-3D and PCM-3D displayed a spindle-shaped, elongated, or cylindrical phenotype with fewer protrusions as well as less total cell spread area than on the 2D matrix. MTT assay showed cell viability higher in cultures grown on BCol-2D and PCM-3D than in BCol-3D ($p < 0,001$). Higher percentage of HGF in the cell cycle could be seen in BCol-2D followed by BCol-3D and PCM-3D, respectively, in all of the experimental groups. The expression of non-collagenous and cytoskeletal proteins were similar in both matrices during all the period of the study. **Conclusion:** PCM-3D is suitable for HGF culture, since, within the matrix, important properties were found, among them, morphology, proliferation and protein expression, similar to those observed in a 3D collagen matrix well established in the literature.

Key-words: Porcine collagen matrix, Gingival fibroblasts, Three-dimensional culture Tissue engineerin.

INTRODUCTION

Tissue engineering is an emerging interdisciplinary field that applies the principles of engineering and life sciences in the development of biological substitutes that restore, maintain or improve tissue function^{1,2}. Tissue engineering involves three strategies adopted for the creation of new tissues: isolated cells, biocompatible scaffolds and signaling molecules^{3,4}. Tissue engineering technology through autogenous cell transplantation is one of the most promising therapeutic concepts being developed in order to solve several problems, including donor site morbidity from autogenous grafts, immunogenicity of allogeneic grafts and loos of alloplastic implants⁵.

Nowadays, the primary goals of mucogingival surgery have changed from mainly restoring or maintaining gingival health to concomitantly solving patients' esthetic demands⁶. With the aim of improve both functional and esthetic outcomes, autogenous grafts are commonly used and can be harvested from different sites of the mouth, such as the palate and the edentulous ridges. Regardless of the excellent esthetic results and the high technical predictability⁷, they present some limitations including donor area morbidity, amount of

donor tissue available, and maintenance of the clinical characteristics of the donor area.

In order to avoid patient morbidity and to overlap inherent limitations of autogenous graft, different techniques and materials, such as allografts, xenografts or soft tissue engineered grafts, have been proposed as soft tissue substitutes. Among them, the allogeneic acellular dermal matrix graft (Alloderms, Life Cell Corporation, The Woodlands, TX, USA) has been the most frequently used^{8,9}. However because this allograft material is derived from human cadavers, it is associated with ethical concerns and the possible risk of disease transmission. An alternative option, avoiding both, the need of palatal donor tissue and allograft material, is the use of collagen matrices of porcine origin, which are already standard in oral wound healing procedures in association with bone augmentation^{10,11}. Recently, a new porcine collagen matrix (PCM-3D- Geistlich Mucografts, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland) has been developed and its qualitative properties and safety have been evaluated following the ISO 14971 and ISO 10993-1 guidelines. The clinical efficacy of this new PCM-3D was assessed to build up a clinically sufficient width of newly formed gingiva/mucosa as well as to cover Miller class-I and class-II recessions^{12,13}.

Fibroblasts play an important role in wound healing and tissue repair. These cells accelerate the healing process by regulation of matrix deposition¹⁴⁻¹⁶ and synthesis of a variety of growth factors, including angiogenic factors (vascular endothelial growth factor [VEGF]), matrix-stimulating factors (transforming growth factor- β 1), and keratinocyte growth factor¹⁷. Fibroblast cultures in different matrices have been investigated as an alternative to achieve early healing, improve incorporation and reduce the contraction of the graft in soft tissue reconstructive procedures or soft tissue augmentation¹⁸⁻²¹. However to achieve success with this therapy is important to find an optimal scaffold, able to maintain the architecture for the formation of a new tissue, keep the distances between the parenchyma cells to allow diffusion of gases and nutrients, and possibly the invasion of blood vessels from the surrounding host tissues^{22,23}. Even more important than these characteristics, an ideal material for tissue engineering should provide collagen density and strength to allow the distribution of cells throughout the scaffold^{24,25}.

The aim of this investigation was to verify morphologic immunohistochemically if PCM-3D is an appropriate three-dimensional matrix, through its *in vitro* response to gingival fibroblasts, by comparison with a bidimensional and a three-dimensional matrix widely established in the literature.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture

Three healthy patients, non-smokers, without systemic diseases, periodontal disease or any other oral infection who required to be submitted to periodontal surgery involving healthy gingival tissue removal were selected for this study. Human gingival fibroblasts (HGF) were established from healthy keratinized gingiva from palate of the patients by explant technique, as described previously by Somerman et al²⁶. In short, after removal of the epithelium, tissues were washed and sliced into pieces of about 1mm³ and transferred to 25 cm² flasks[†], with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)[‡] supplemented with 10% fetal bovine serum[‡] and 250 ng/mL of vancomycin[§], 0.5 ml/mL of gentamicin[‡], and 50 ng/mL of fungisone[‡] (D10). Cultures were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and the medium was changed every 2 to 3 days. When confluent, cells surrounding the explants were harvested using a solution of trypsin and EDTA at 0.05%^{††} and transferred to 75 cm² flasks^{‡‡}. Cells between passages two and three were used. The protocol was approved by the Institutional Committee of Ethics in Research (Protocol #2007.1.1234.58.5) of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Tissue Culture

Three-Dimensional Porcine Collagen Matrix (3D-PCM)

All experiments were performed with XCM of the same batch to avoid variations. Primarily, a specimen of 20 x 30 mm was sliced into pieces of about 10 x 10 mm each. Cells were seeded at a density of 1x10⁶ cells per well, and grown for periods of up to 10 days in 6-well-plates. The plates were maintained with 1000 µL of the D10. Cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂, and the medium was changed every 2 to 3 days.

Bovine three-dimensional collagen (BCol-3D)

For the preparation of the three-dimensional collagen scaffold bovine type I collagen^{§§} (Collagen I, Bovine, 30 mg) was used according to manufacturer's instructions. Collagen

[†] Corning Incorporated, NY, USA

[‡] Gibco BRL Invitrogen, Gaithersburg, MD

[§] Acros Organics, Gell, Belgium

^{††} Gibco

^{‡‡} Corning

^{§§} BD Biosciences, MA

comes in liquid form at concentration of 3 mg/mL. Primarily, PBS^{¶¶} was added to the original volume of collagen to obtain a concentration of 2 mg/mL. In addition, D10 and solution of NaHCO₃ and NaOH were added to produce a final solution at pH 7.4 ± 0.2. After addition of all components in a 15 mL Falcon^{††} tube, homogenization was carried out, followed by the insertion of 250 µL of the final solution into a teflon device of 10 x 10 x 2mm over a glass coverslip^{†††} previously fixed in the back of the 6-well- plates with 10 µL of Col 3D, in order to obtain a control material with the same size and shape as the test material. Thereafter, the plates were maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 20 min at 37° C to promote gelling of the matrix. Finally, the cells along with 1 mL of D10 were seeded at density of 1 x 10⁶ cells / well by the over lay method.

Bovine bidimensional Collagen (BCol-2D)

To prepare the Col 2D scaffold, as well as for the three-dimensional, bovine type I collagen was used^{†††} (Collagen I, bovine, 30mg), according to the manufacturer's information. For this purpose, the initial collagen solution was diluted (50 mg / mL collagen in PBS). Subsequently, 100 mL of the collagen solution was placed over each glass coverslip^{†††} secured in a 6-well-plate with 10 µL of Col 3D and maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air atmosphere at 37 ° C for 1 hour. After this period, the remaining solution of collagen on each 2D coverslip was aspirated. Then the cells were plated at a density of 1x10⁶ cells / well with 1 mL of D10.

Cellular morphology and distribution in PCM-3D, BCol-2D and BCol-3D

Cell morphology was assayed by direct fluorescence at 3, 7 and 10 days. HGF were fixed for 10 min at room temperature (RT) using 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (PB), pH 7.2. After being washed in PB, cultures were processed for fluorescence labeling. Briefly, they were permeabilized with 0.5% Triton X-100^{§§§} in PB for 10 min, followed by blocking with 5% skimmed milk in PB for 30 min. Alexa fluor 488 (green fluorescence) conjugated phalloidin (1:200)^{¶¶¶¶} was used to label actin cytoskeleton. Before mounting for microscope observation, samples were briefly washed with deionized water (dH₂O), and the cell nuclei were stained with 300 nM 40,6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI)^{¶¶¶} for 5 min. Matrices were placed face up on glass slides, covered

---

¶¶ Gibco

††† Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA

††† BD Biosciences

§§§ Acros Organics

¶¶¶¶ Molecular Probes; Invitrogen, Eugene, OR

with 12-mm round glass coverslips^{§§§} and mounted with an antifade kit^{†††}. The samples were then examined under laser scanning fluorescence confocal microscopy Leica SP2^{‡‡‡}, using LCS LITE software^{†††}. Images were collected through a 20x 0.7/ oil immersion or 40 x 1.5/oil immersion plan apochromatic objective. Acquired digital images were processed with Image J software^{***}.

Immunolocalization of the extracellular matrix collagen protein and non-cytoskeletal proteins

At days 3, 7, and 10, samples were fixed for 10 min at -20°C using absolute methanol^{§§§} for immunolocalization of extracellular matrix proteins non-collagenous - fibronectin and cytoskeletal proteins - actin and tubulin by indirect immunofluorescence labeling assay²⁷⁻²⁹. Each sample was washed 3 times for 5 min in PB, followed by blocking with 5% skimmed milk in PB for 30 min. Firstly, monoclonal antibody to tubulin (1:200)^{¢¢¢}, actin (1:100)^{ººº} and fibronectin (1:100)^{ººº} was used, followed by a mixture of Alexa Fluor 594 (red fluorescence, 1:200)^{¶¶¶} conjugated goat anti-mouse secondary antibody (1:200)^{¶¶¶}. All antibody incubations were performed in the humid atmosphere for 60 min at room temperature. Between each incubation the samples were washed three times (5 min each) in PB. Before mounting for microscope observation, cell nuclei were stained with 300 nM DAPI^{††††} for 5 min and samples were briefly washed with deionized water (dH₂O). Samples were mounted face up on glass slides, while a Fisherbrand 12 mm round glass coverslip^{‡‡‡‡} was mounted with an antifade kit^{****} on the surface containing cells. The samples were then examined under fluorescence confocal microscope SP2^{§§§§}. The acquired digital images were processed with Image J software^{§§§§}.

Cell Proliferation by immunolocalization of nuclear antigen Ki-67

Indirect immunofluorescence method was used to establish the percentage of cells in cell cycling, by Ki-67 molecular localization on cellular nucleus. Hystochemical proceeding for

---

§§§ Fisher Scientific

††† Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA

‡‡‡ Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Germany

*** National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland

§§§ Merck, Darmstadt, Germany

¢¢¢ Sigma-Aldrich, St Louis, EUA

†††† Molecular Probes

‡‡‡‡ Fisher Scientific

**** Vectashield

§§§§ Leica

§§§§ National Institute of Mental Health

Ki-67 labeling followed the same protocol described previously, using a polyclonal human primary antibody anti-Ki-67 (1:70)^{§§§§}, followed by a secondary antibody goat anti-rabbit 594 (1:200)^{††††}.

Cell Viability

Cell viability was evaluated by 3-[4,5-dimethylthia-zol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)^{¶¶¶¶} assay³⁰. At 3, 7 and 10 days, specimens seeded with HGF were incubated with 10% of MTT (5 mg/ml) in culture medium at 37°C for 4 hours. The medium was then aspirated from the well, and 1 ml of acid isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol) was added to each well. The plates were then stirred on a plate shaker for 5 minutes, and 150 µL of this solution was transferred to a 96-well format using opaque- walled transparent-bottomed plates^{*****}. The optical density was read at 570 to 650 nm on the plate reader iQuant^{†††††} and data were expressed as absorbance.

STATISTICAL ANALYSES

Data presented in this study are the mean of the results of three separate sets of cultures for HGF, established from three different patients. All experiments were carried out in triplicate (n = 3). Comparisons of protein expression were performed using the nonparametric Friedman test, and comparisons of total cell number, viability and proliferation were performed using Kruskal-Wallis followed by Tukey test for multiple comparisons between groups (significance level, 5%).

RESULTS

Cell Morphology and Distribution on PCM-3D, BCol-2D and BCol-3D

Morphologic analyses by direct fluorescence showed that at 3 days HGF were adherent in all of the experimental groups. HGF grown on BCol-2D were broader, more flattened and had more cell protrusions and stress fibers in all experimental times. On the other hand, HGF seeded on BCol-3D and PCM-3D displayed a spindle-shaped, elongated, or cylindrical phenotype with fewer protrusions as well as less total cell spread area than on the 2D matrix, with some cells on PCM-3D with a stellate appearance. In the PCM-3D and BCol-3D, HGF

---

§§§§ Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA, USA

¶¶¶¶ Sigma-Aldrich

***** Fisher Scientific

††††† Biotek, Winooski, VT

were distributed irregularly throughout the matrix forming a network interconnected by gap junctions. The PCM-3D showed higher concentrations of cells forming true clusters in the less compact layer than in the more compact layer with a higher fiber density, where the cells were more spaced through the whole period studied.

Cell Viability

MTT assay showed higher cell viability in cultures grown on PCM-3D in 3 days than in 7 and 10 days, which was statistically significant only between 3 and 7 days ($p=0.006$). Regarding intergroups analysis, at 3 days HGF seeded on PCM-3D showed a greater viability than those grown on BCol-3D ($p<0.001$), likewise cultured on BCol-2D showed greater viability than those grown on BCol-3D ($p<0.001$), an event which was repeated in the experimental periods of 7 and 10 days.

Total Cell Number

The total number of cells per sample from different experimental groups was determined by count per epifluorescence. At 3 days a greater number of cells in BCol-2D samples followed by PCM-3D and BCol-3D respectively, was observed with statistical difference between Col 2D and XMC and between BCol-2D and BCol-3D ($p<0,001$). At 7 days, the number of cells decreased in Col 2D and increased in Col 3D and PCM-3D, where the number of cells were significantly higher in BCol-2D in relation to PCM-3D ($p=0.002$). At the end of the experimental period, there was an increase in total cell number in all of the experimental groups, and it was again significantly greater in BCol-2D than in PCM-3D ($p=0.005$). Between 3 and 10 days, there was a significant increase in total cell number in Col 3D, which showed higher count within 10 days.

Cell Proliferation

The proportion of proliferating cells in samples of the different experimental groups was determined at 3, 7 and 10 days by counting of the cells expressing the nuclear antigen Ki-67 per epifluorescence. shows the mean percentage of cells expressing Ki-67. A higher percentage of HGFs at cell cycle G0 grown on BCol-2D followed by BCol-3D and PCM-3D respectively, in all experimental periods. Cells on PCM-3D almost not labeled by Ki-67 and BCol-2D samples demonstrated significant decrease in HGFs cycling between 3 and 10 days.

Fibronectin Expression

At 3 days a higher expression of fibronectin per cell in BCol-3D followed by BCol- 2D and PCM-3D was observed respectively, which was maintained at 7 days and had a slight modification at 10 days where PCM-3D showed a short increase in expression while BCol-3D and BCol-2D experienced reduction. In the intragroup evaluation increase in expression per cell between 3 and 7 days and decrease between 7 and 10 days was observed, and in PCM-3D there was an increase in expression during the entire experimental period. Although numerical differences were observed between and within groups they were not significant (Table 1).

Actin Expression

At 3 days a higher expression of actin per cell in PCM-3D followed by BCol-2D and BCol-3D was observed. On the seventh day there was a decrease in expression in PCM-3D followed by BCol-2D and BCol-3D. At the end of the experimental period a decrease in expression could be seen in all of the experimental groups and in intragroup analysis there was a significant higher expression per cell in BCol-3D in 7 days than in 3 days (Table 1).

Tubulin Expression

At 3 days a higher expression of tubulin per cell in BCol-3D than in BCol-2D and PCM-3D was observed with BCol-2D showing slightly higher expression than in BCol-3D and PCM-3D, however no significant differences were identified. AT 7 days the expression increased in BCol-2D and BCol-3D and decrease in PCM-3D. Although the expression was numerically higher in Col 3D when compared to BCol-2D there was no statistical significance. At the end of the experimental period there was greater expression in BCol-2D followed by PCM-3D and BCol-3D. The intragroup analysis showed marked increase of the expression per cell in BCol-3D between 3 and 7 days and decrease between 7 and 10 days. Although numerical differences were observed between and within groups there were not significant (Table 1).

DISCUSSION

Tissue engineering represents an important advance for regenerative fields. The periodontal literature has already reported the use of tissue engineering techniques involving seeding of autogenous cells in different scaffolds as an intelligent way of delivering growth factors to a healing site ^{19,20,31}. However, there are some lacks in the determination of biomaterials that can be employed as a substitute for autogenous soft tissue grafts⁸.

In the present study, we evaluated the behavior of HGF grown on PCM-3D with the

purpose of evaluating the effectiveness of this matrix as a three-dimensional scaffold. Thus, the PCM-3D was compared to a 2D collagen substrate, widely discussed in the literature³²⁻³⁴ and a 3D collagen gel. The collagen gel has been one of the most widely used scaffold for cell culture in tissue engineering^{35,36}, so it would be interesting to start our experiments with a matrix of already well established in the literature, using as a 3D control.

PMC-3D was chosen as a scaffold for gingival fibroblasts because of its three-dimensional feature, suitable to be implanted in a host. PMC has already been shown to incorporate well into host tissues³⁷ *in vivo* and it provides favorable clinical outcomes in procedures for gingival tissue augmentation^{12,37} and root coverage^{13,38-40}. Some studies were conducted to evaluate the effectiveness of PCM-3D as a subepithelial graft compared to autogenous subepithelial connective tissue graft, with similar results between the two techniques with regard to root coverage^{13,37-40} and gingival thickness^{12,37}. However, studies have shown that autogenous grafts can result in shorter healing time³⁷. Thus, with the incorporation of autogenous cells, there could be an optimization and reduction in the time incorporation of PMC, allowing for better clinical results.

Furthermore, PMC is a highly purified bilayer membrane consisting of porcine collagen type I and III. The collagen structure resembles human collagen origin very well because disturbing lipids as well as proteins and telopeptides that could result in immunologic reactions of the host are completely removed. Type I collagen, the major structural protein present in tissues, additionally, provides the necessary strength to accommodate the mechanical loading to which these tissues are commonly subjected⁴¹. Type III collagen is found within the submucosal tissue, a location in which tissue flexibility and compliance are required for appropriate of studies show that while cells in a 2D culture system form a confluent cell layer. In the 3D system cells stop their growth, and few days after being cultured show morphologic appearance and spatial distribution resembling cells *in vivo*, maintaining their stellate shape, with polymorphic presentation and interacting with each other by cytoplasmatic extensions interconnected by gap junctions. This results in the formation of spaces in which ECM is deposited^{17,31,36,46-48}

Current literature^{31,49-53} provides some studies in which ingrowth of fibroblastic cells into three-dimensional matrices was observed. Hillmann et al.³¹ evaluating the growth of gingival fibroblasts in a three-dimensional polyester carrier system, reported the presence of cell multilayer overlying the surface of the carrier grid and a similar cellular density at the margin and in the center of the matrix. Ojeh *et al.*⁴⁹ observed that fibroblasts had migrated

through half of the total depth of a dermal equivalent at 14 days. Moscato *et al.*⁵⁰ showed fibroblasts spread on the surface and across a sponge matrix prepared by a mixture of poly (vinyl alcohol) and gelatin. Kasaj *et al.*⁵¹ also demonstrated a lower proliferation rate of HGF in matrices with dense structure. Rodrigues *et al.*⁵² and Maia *et al.*⁵³ corroborates with this result showing that the dense architecture of an allogeneic collagen matrix limited cell proliferation into of its structure. Similarly, our study showed fewer cells in PCM-3D dense layer than in the less dense layer. Probably, the collagen fibers of the compact layer of the PCM-3D, have arranged themselves in a very dense form, providing a limiting factor for the occurrence of a homogeneous cell distribution. On the other hand, in the less denser layer higher number of was observed cells, which in turn were distributed more homogenously, due to the fact that the higher porosity and interconnectivity of the pores of this layer facilitated nutrients diffusion, allowing *in vitro* cell growth. This finding seems quite interesting from the point of view of the materials indication as a membrane for guided tissue regeneration, thereby serving the compact layer as barrier to unwanted cells and the loose layer as scaffold for the relevant cells types relevant to tissue regeneration.

In cell cultures, increasing cell number depends on the establishment of cell-to-cell interactions, which limits the proliferation of fibroblasts and induces their exit from the cell cycle⁵⁴. Indeed, while at day 3 fibroblasts grown on BCol-2D and BCol-3D were cycling cells, at day 7 they exhibited reduced cell proliferation rate. At 10 days, was observed that cells grown on BCol-3D stopped to proliferate while those grown on BCol-2D maintained some proliferation activity. This observation is consistent with previous results^{31,55} that showed function. Due to the presence of PMC-3D in purified form not exhibiting additional cross-links the ECM does not elucidate xenogenous foreign body reaction, avoiding the formation of fibrous capsule, slow degradation and dramatically altering the remodeling response of the host, making this matrix especially interesting⁴².

In this study, morphology and HGF distribution showed remarkable differences between 2D and 3D matrices. Between 3D matrices these characteristics were quite similar. The research continues to compare viability and total cell number in samples of the three experimental groups, as well as cell proliferation and expression of non-collagenous ECM proteins – fibronectin, and cytoskeletal proteins – actin and tubulin. Cell viability was higher in BCol-2D and in PCM-3D than in BCol-3D, which was significantly lower in BCol-3D when compared to these. Thus, morphologic analysis by epifluorescence showed that HGF, in each 3D collagen matrix tend to display a more cylindrical or spindle-shaped phenotype, with

fewer protrusions, as well as less total spread area than on a 2D matrix. This shape resembles the phenotype of fibroblasts and mesenchymal cells *in vivo*⁴³⁻⁴⁵. GHF seeded on BCol-2D, showed a less elongated, broader and more flattened morphology with more cell protrusions and stress fibers. Furthermore, at 7days HGF were spread out over most of the matrix area. These results are in accordance with those previously described in literature, where a series

HGF proliferation in 3D matrix is lower than in 2D rigid substrates. Cells grown on PMC-3D almost not demonstrate expression of the nuclear antigen Ki-67, however, we believe that these cells present proliferative activity similar to those observed in fibroblast seeded on BCol-3D addressed in this study, since they demonstrate cell viability and protein expression. We believe that there has been some unfavorable interaction between the method used to detect the proliferation and some of the constituents of PCM-3D (Sch). Fibroblasts in a three-dimensional lattice demonstrate profound differences in proliferative and biosynthetic capacities in comparison to monolayer cultures. To a certain extent these differences may be due to a modified responsiveness to growth factors. But obviously they are attributed to cell-matrix interactions delivering chemical and mechanical signals^{57,58}. Fibroblasts do not proliferate under normal *in vivo* conditions³¹. Therefore, the relatively lower proliferative response of fibroblasts in the 3D culture system described here may be a more realistic estimate of the *in vivo* behavior of the cells than in 2D cultures.

Ingrowth of gingival fibroblasts was analyzed by staining of viable cells through MTT assay, and production of ECM proteins was displayed by indirect immunofluorescence. Tissue remodeling involves demolition, synthesis, contraction, and reorganization of the tissue^{59,60}. Cells are able to sense mechanical stress and to react by an altered pattern of protein expression that leads to a tissue specific extracellular matrix^{36,61}.

In 2D cell culture, the actin cytoskeleton has been well established to have important roles in cell morphology and migration, as well as linking the cell interior and the ECM through cell adhesions^{62,63}. *In vivo*, however, fibroblasts exhibit few actin stress fibers⁶⁴ except in tissues that undergo constant large mechanical loading⁶⁵. We observed a similar paucity of stress fibers in 3D CDM, collagen, and fibrin, in which only few thin stress fibers were seen near the plasma membrane. Thus, the actin phenotypes in 3D matrices are much more similar to cells *in vivo* than to cells on 2D matrix-coated coverslips. The observation that numerous stress fibers span the cells in all of the 2D models examined in this study is consistent with higher levels of cytoskeletal stress associated with stiff, noncompliant substrates, which promote the formation of focal adhesions and stress fibers^{48,66,67}.

Fibronectin expression by cell revealed to be equal in both 2D and 3D matrices with respect to its quantification. In the 2D matrix fibroblasts deposited an elaborated extensive fibronectin network showing intense remodeling activity. However, in 3D matrices the fibronectin network appeared less elaborated with shorter fibrils and in few numbers. Demonstrating the influence of matrix elasticity on ECM deposition and remodeling. This finding is consistent with Mauch *et al.*⁵⁵ and with the *in vitro* evaluation performed by Mathes *et al.*⁶⁸ at the same PMC-3D used in this study, which demonstrate growth of HGF within de PMC-3D, resulting in increased fibronectin expression only when cultured was performed mechanically treated in bioreactor and perfused.

The reduced synthesis of non-collagenous proteins clearly shows that the growth of fibroblasts in 3D collagen matrices has many effects on their biosynthetic activity. Stable levels of tubulin suggest that reduced synthesis of collagen does not reflect the general depression of cell activity, but resembles a reprogramming of selected functions. The preservation of tubulin levels in BCol-2D, BCol-3D and PCM-3D demonstrated in this study are supported by the observation of Mauch *et al.*^{55,69} and Unemori & Werb⁷⁰ that observed an equivalence of tubulin expression in both 2D and 3D matrices evaluated and cell morphology in collagen matrices depend largely on the organization of microtubules.

Another important fact observed was the large variation between the samples, indicated by high standard deviations in both morphology and distribution experiments as in viability tests. This variation is caused in part by differences resulting from specific features of each individual because data represent the mean of results obtained in the cells seeded from three different subjects. From our point of view the results of this study are promising, and motivate the use of most renowned techniques for protein quantitation for increased reliability of our results, and subsequent use the PCM-3D, a product of tissue engineering, in an animal model to evaluate their behavior *in vivo*.

CONCLUSION

This study shows that PCM-3D is a suitable matrix for human gingival fibroblasts cultivation, since important properties were found inside the matrix, such as morphology, proliferation and expression of proteins similar to those seen in a three-dimensional collagen matrix well established in the literature.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the PhD student Danilo Maeda Reino, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil for his help with statistical analyses and the PhD student Lucas Novaes Terixeira and the laboratory assistant Roger Fernandes, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP for their assistance with epifluorescence analyses.

REFERENCES

1. Sipe JD. Tissue engineering and reparative medicine. *Ann N Y Acad Sci* 2002;961:1-9.
2. Taba M Jr., Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV. Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod Craniofac Res* 2005;8:292-302.
3. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-926.
4. Izumi Y, Aoki A, Yamada Y, Kobayashi H, Iwata T, Akizuki T, Suda T, Nakamura S, Wara-Aswapati N, Ueda M, Ishikawa I. Current and future periodontal tissue engineering. *Periodontol 2000* 2011;56:166-187.
5. Zucchelli G, Sanctis MD. Long-term outcome following treatment of multiple Miller class I and II recession defects in esthetic areas of the mouth. *J Periodontol* 2005; 76:2286-2292.
6. Borghetti A, Louise F. Controlled clinical evaluation of the subpedicle connective tissue graft for the coverage of gingival recession. *J Periodontol* 1994;65:1107-1112.
7. Park JB. Increasing the width of keratinized mucosa around endosseous implant using acellular dermal matrix allograft. *Implant Dent* 2006;15:275-281.
8. Thoma D, Benic G, Zwahlen M, Hämmerle C, Jung R. A systematic review assessing soft tissue augmentation techniques. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20(4):146-165.
9. Hämmerle C, Karring T. Guided bone regeneration at oral implant site. *Periodontol 2000* 1998;17:151-175.
10. Wallace SS, Forum SJ. Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. *Ann Periodontol* 2003;8:328-343.
11. Cairo F, Pagliaro U, Nieri M. Treatment of gingival recession with coronally advanced flap procedures: A systematic review. *J Clin Periodontol* 2008;35(8):136-162.
12. Sanz M, Lorenzo R, Aranda JJ, Martin C, Orsini M. Clinical evaluation of a new collagen matrix (Mucograft prototype) to enhance the width of keratinized tissue in patients with fixed prosthetic restorations: a randomized prospective clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009; 36: 868-876.
13. McGuire MK, Scheyer ET, Nunn ME, Lavin PT. A pilot study to evaluate a tissue-engineered bilayered cell therapy as an alternative to tissue from the palate. *J Periodontol* 2008;79:1847-1856.
14. Demarchez M, Hartmann DJ, Regnier M, Asselineau D. The role of fibroblasts in dermal vascularization and remodeling of reconstructed human skin after transplantation onto the nude mouse. *Transplantation* 1992;54:317-326.
15. Marks MG, Doillon C, Silver FH. Effects of fibroblasts and basic fibroblast growth factor on facilitation of dermal wound healing by type I collagen matrices. *J Biomed Mater Res* 1991;25:683-696.
16. Okamoto E, Kitano Y. Expression of basement membrane components in skin equivalents

- Influence of dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci* 1993;5:81-88.
17. Naughton G, Mansbridge J, Gentzkow G. A metabolically active human dermal replacement for the treatment of diabetic foot ulcers. *Artif Organs* 1997;21: 1203-1210.
18. Izumi K, Feinberg SE, Iida A, Yoshizawa M. Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: a preliminary report. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; 32: 188-197.
19. Yamada K, Yamura J, Katoh M, Hata KI, Okuda K, Yoshie H. Fabrication of cultures oral gingiva by tissue engineering techniques without materials of animal origin. *J Periodontol* 2006;77:672-677
20. Novaes Jr AB, Marchesan JT, Macedo GO, Palioto DB. Effect of In VitroGingival Fibroblast Seeding on the In Vitro Incorporation of Acellular Dermal Matrix Allografts in Dogs. *J Periodontol* 2007;78:296-303.
21. Jhaveri HM, Chavan MS, Tomar GB, Deshmukh VL, Wani MR, Miller PD Jr. Acellular dermal matrix seeded with autologous gingival fibroblasts for the treatment of gingival recession – a proof of concept study. *J Periodontol* 2010;81(4):616-625.
22. Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 1998;16:224-30.
23. Vacanti JP, Langer R, Upton J, Marler JJ. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;33:165-182.
24. Hillmann G, Steinkamp-Zucht A, Geurtsen W, Gross G, Hoffmann A. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. *Biomaterials*. 2002;23:1461-9.
25. Kasaj A, Reichert C, Götz H, Röhrig B, Smeets R, Willershausen B. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. *Head Face Med* 2008 Oct 14;4:22.
26. Somerman MJ, Archer SY, Imm GM, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts *in vitro*. *J Dent Res* 1988;67(1):66-70.
27. De Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 2004;25:403-413.
28. De Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res A* 2007;80:554-564
29. Schwartz Fo HO, Novaes AB Jr, de Castro LM, Rosa AL, de Oliveira PT. In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. *Clin Oral Implants Res* 2007;18:333-344.
30. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;16:55-63.
31. Hillmann G, Gebert A, Geurtsen W. Matrix expression and proliferation of primary gingival fibroblasts in a three-dimensional cell culture model. *J Cell Sci* 1999;112:2823-2832.
32. Roskelley CD, Desprez PY, Bissell MJ. Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(26):12378-12382.
33. Streuli CH, Bailey N, Bissell MJ. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *J Cell Biol* 1991;115(5):1383-1395.
- 34 Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(10):839-845.
- 35.Friedl P. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16(1):14-23.

36. Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol* 2003;13(5):264–269.
37. Nevins M, Nevins ML, Kim SW, Schupbach P, Kim DM. The use of mucograft collagen matrix to augment the zone of keratinized tissue around teeth: a pilot study. 2001;31(4):367-73.
38. Camelo M, Nevins M, Nevins ML, Schupbach P, Kim DM. Treatment of gingival recession defects with xenogenic collagen matrix: a histologic report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2012; 32(2):167-173
39. Reino DM, Novaes AB Jr, Fernandes PG, Maia LP. Uso do Mucograft no tratamento de retração gengival. *Rev Dental Press Implantol* 2011; 5(2):74-82.
40. Reino DM, Maia LP, Fernandes PG, Novaes AB Jr. Tratamento de retração gengival através da técnica de retalho estendido associado ao uso de mucograft. *Periodontia* 2012;6(2):146-51.
41. Barnard EK, Gathercole LJ. Short and long range order in basement membrane type IV collagen revealed by enzymatic and chemical extraction. *Int J Biol Macromol* 1991;13(6):359– 365.
42. Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant Immunology* 2004;12:367-377.
43. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 2001; 294(5547):1708-1712
44. Friedl P, Bocker EB. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 2000;57(1):41-64.
45. Beningo KA, Dembo M, Wang YL. Responses of fibroblasts to anchorage of dorsal extracellular matrix receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(52):18024–18029.
46. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:349–
47. Rhee S, Grinnell F. Fibroblast mechanics in 3D collagen matrices. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59(13):1299–1305.
48. Hakkinen KM, Harunaga JS, Doyle AD, Yamada KM. Direct Comparisons of the Morphology, Migration, Cell Adhesions, and Actin Cytoskeleton of Fibroblasts in Four Different Three-Dimensional Extracellular Matrices. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(5-6):13-14.
49. Ojeh NO, Frame JD, Navsaria HA. In vitro characterization of an artificial dermal scaffold. *Tissue Eng* 2001;7(4):457-472.
50. Moscato S, Mattii L, D'Alessandro D, et al. Interaction of human gingival fibroblasts with PVA/gelatin sponges. *Micron* 2008;39(5):569-579.
51. Kasaj A, Reichert C, Götz H, Röhrig B, Smeets R, Willershausen B. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. *Head Face Med* 2008;4(22):1-8.
52. Rodrigues AZ, Oliveira PT, Novaes Jr AB, Maia LP, Souza SLS, Palioto DB. Evaluation of *In Vitro* Human Gingival Fibroblast Seeding on Acellular Dermal Matrix. *Braz Dent J* 2010; 21(3):179-185.
53. Maia LP, Novaes Jr AB, Souza SLS, Grisi MFM, Taba Jr M, Palioto DB. In Vitro Evaluation of Acellular Dermal Matrix as a Three-Dimensional Scaffold for Gingival Fibroblasts Seeding. *J Periodontol* 2011;82(2):293-301.
54. Holley RW. Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature* 1975; 11:487-490
55. Mauch C, Hatamochi A, Scharffetter K, Krieg T. Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three-dimensional collagen gel. *Exp Cell Res* 1988;178(2):493-503.

56. Schor SL. Cell proliferation and migration on collagen substrat *in vitro* *J Cell Sci* 1980;41Ç159-175.
57. Eckes B, Krieg T, Nussgens BV, Lapiere CM. In vitro reconstituted skin as a tool for biology, pharmacology and therapy: a review. *Wound Rep Reg* 1995;3:248-257
58. Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *Cell Biol* 1994;124:401-404.
59. Koopmann CJ. Cutaneous wound healing. An overview. *Otolaryngol Clin North Am* 1995Ç28(5):835-845.
60. Schultze-Mosgau S, Blatz M, Wehrham F, Schlegel K, Thorwart M, Holst S. Principles and mechanisms of peri-implant soft tissue healing. *Quintessence* 2005;36(10):759-769.
61. Chiquet M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol* 1999;18(5):417-426.
62. Le Clairche C, Carlier MF. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev* 2008;88(2):489-513.
63. Gardel ML, Schneider IC, Aratyn-Schaus Y, Waterman C. Integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010;26:315.
64. Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14(5):538-546.
65. Ralphs JR, Waggett AD, Benjamin M. Actin stress fibres and cell-cell adhesion molecules in tendons: organisation *in vivo* and response to mechanical loading of tendon cells *in vitro*. *Matrix Biol* 2002;21(1):67-74.
66. Bershadsky AD, Balaban NQ, Geiger B. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003;19:677-95.
67. Dubash AD, Menold MM, Samson T, Boulter E, Garcia-Mata R, Doughman R, Burridge K. Chapter 1. Focal adhesions: new angles on an old structure. *Int Rev Cell Mol Biol* 2009; 277:1-65.
68. Mathes SH, Wohlwend L, Uebersax L, Von Mentlen R, Thoma DS, Jung RE, Görlach C, Graf-Hausner U. A Biorreactor Test System to Mimic the Biological and Mechanical Environment of Oral Soft Tissues and to Evaluate Substitutes for Connective Tissue Grafts. *Biotechnol Bioeng* 2010;107(6):1029-39.
69. Mauch C, Adelmann-Grill B, Hatamochi A, Krieg T. Collagenase gene expression in fibroblasts is regulated by a three-dimensional contact with collagen. *FEBS Lett* 1989; 250(2):301-5.
70. Unemore EN, Werb Z. Reorganization of polymerized actin: a possible trigger for induction of procollagenase in fibroblasts cultured in and on collagen gels. *J Cell biology* 1996;103:1021-1031

TABLE

Table 1. Mean values $\pm$ SD of the expression of non collagenous protein matrix – Fibronectin (Fibro) and cytoskeletal proteins – Tubulin (Tub) and Actin (Act) presente in PCM-3D, BCol-2D and BCol-3D at 3, 7 e 10 dias.

	Período (dias)	PCM-3D	BCol-2D	BCol-3D	*p-value
FIBRO	3	4,5 $\pm$ 3,0	34,9 $\pm$ 6,5	37,9 $\pm$ 36,6	NS
	7	23,7 $\pm$ 9,9	33,9 $\pm$ 28,1	77,0 $\pm$ 23,5	NS
	10	34,1 $\pm$ 8,4	18,5 $\pm$ 4,9	66,8 $\pm$ 19,4	NS
	**p-value	NS	NS	NS	
TUB	3	18 $\pm$ 6,1	20 $\pm$ 7,4	36 $\pm$ 37,1	NS
	7	15 $\pm$ 11,6	31 $\pm$ 11,8	52 $\pm$ 24,2	NS
	10	21 $\pm$ 11,8	26 $\pm$ 16,7	13 $\pm$ 4,3	NS
	**p-value	NS	NS	NS	
ACT	3	26,6 $\pm$ 2,7	7,2 $\pm$ 1,5	0,0 $\pm$ 0,0 ^A	NS
	7	6,6 $\pm$ 0,4	10,4 $\pm$ 0,6	22,1 $\pm$ 8,2 ^B	NS
	10	2,2 $\pm$ 0,8	8,0 $\pm$ 0,8	16,2 $\pm$ 2,7 ^{AB}	NS
	**p-value	NS	NS	<0.05	

PCM-3D: Three-dimensional porcine collagen matrix; BCol-2D: Bovine bi-dimensional collagen; BCol-3D: Three-dimensional bovine collagen; NS (Not significant – $p > 0,05$).

**Friedman test

Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) in multiple comparative analysis.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Fluorescence labeling of fibroblasts derived from human gingiva cultured on PCM-3D (C, F and I), BCol-2D (A, D and G), and BCol-3D (B, E and H) at 3 (A, B and C), 7 (D, E and F) and 10 days (G, H and I). Cell-associated green fluorescence reveals actin cytoskeleton (Alexa Fluor 488-conjugated phalloidin). Blue fluorescence indicates cell nuclei (DAPI DNA staining). Note the following: on C, F and I GHF grown on BCol-2D are less elongated, broader and more flattened, with more protrusions, stress fibers and more total cell spread area; on C, B, E, F, H and I GHF grown on 3D and PCM-3D with a spindle-shaped, elongated, or cylindrical phenotype with fewer protrusions, distributed irregularly forming a network throughout the matrix interconnected by gap junctions; on F and I HGF showed a stellate appearance PCM-3D. Scale bar = 100 μ m.

Figure 2. Cell viability rate of GHF grown on PCM-3D, BCol-2D and BCol-3D at 3, 7 and 10 days expressed as absorbance. Data are reported as mean $\pm$ standard deviation. Bars and asterisks indicate statistically significant difference ($p < 0.05$) for comparison between and within groups.

Figure 3. Growth curve of HGF cultured on PCM-3D, BCol-2D and BCol-3D for sample at 3, 7 and 10 days. Data are reported as mean $\pm$ standard deviation. Bars and asterisks indicate statistically significant difference ($p < 0.05$) for comparison between and intragroups.

Anexo

ANEXO

Anexo A – Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 3602-3963
 14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
 Fax: (016) 3633-0999

OF.CEP/378/FORP

Ribeirão Preto, 26 de novembro de 2007.

Prezado (a) Professor(a),

Ref.: Processo nº 2007.1.1234.58.5
Caae n. 0058.0.138.000-07

De ordem da Senhora Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, informamos que o referido Comitê, em sua 83ª Sessão, realizada no dia 22 de novembro de 2007, **aprovou** o Projeto de Pesquisa envolvendo seres humanos intitulado: **"Avaliação do cultivo de fibroblastos gengivais humanos na matriz dérmica acelular (Alloderm)"**, a ser desenvolvido por Vossa Senhoria na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, devendo o atestado para publicação final ser expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa, após a entrega e aprovação do Relatório Final pelo referido Comitê.

Na oportunidade, esclarecemos que o **Relatório Parcial** deverá ser encaminhado à Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa até o dia **30 de novembro de 2008**, e o **Relatório Final** até o dia **30 de dezembro de 2009**, acompanhados do Formulário que se encontra no *site* da FORP/USP (*link*: Colegiados e Comissões - Comitê de Ética em Pesquisa - Formulários do Pesquisador para entrega dos Relatórios Parcial ou Final).

Atenciosamente,

Luci Rose Nassif Menezes

Secretária "ad hoc" do Comitê de Ética em Pesquisa

RECEBI O ORIGINAL

28/11/07 às _____ hs

Ilma. Sra.

Profa. Dra. DANIELA BAZAN PALIOTO BULLE

Professora Doutora do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia FORP/USP

GDR/bqcp