UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

LUCIANA PRADO MAIA

**Avaliação *in vitro* de matriz dérmica acelular como arcabouço tridimensional
para cultivo de fibroblastos gengivais**

Ribeirão Preto

2010

LUCIANA PRADO MAIA

**Avaliação *in vitro* de matriz dérmica acelular 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

Ribeirão Preto

2010

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 a fonte.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Maia, Luciana Prado

Avaliação *in vitro* de matriz dérmica acelular como arcabouço tridimensional para cultivo de fibroblastos gengivais. Ribeirão Preto, 2010.

83 p.: il.; 30cm

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

Orientadora: Palioto, Daniela Bazan

1. Cultura de células. 2. Fibroblastos gengivais. 3. Engenharia de tecidos. 4. Matriz dérmica acelular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luciana Prado Maia

Avaliação *in vitro* de matriz dérmica acelular 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: ____ / ____ / 2010

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **ANTONIO** e **MARIA DALVA**, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, sendo para mim o melhor exemplo a seguir. Agradeço pelo respeito e apoio às minhas escolhas, não medindo esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Nem com todas as palavras do mundo conseguiria expressar toda a gratidão e admiração que sinto por vocês.

Às minhas irmãs, **CÍNTIA** e **LARISSA**, por me inspirarem a sempre seguir em frente. Vocês são minhas melhores amigas e eternas companheiras.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por guiar meus passos para que pudesse chegar com êxito ao final de mais uma etapa, e pela proteção e imensurável amor, sem os quais seria impossível superar as dificuldades.

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Daniela Bazan Palioto**, pelos ensinamentos e por acreditar e confiar em mim em todos os momentos. Obrigada por me fazer buscar o conhecimento e, principalmente, pelos incentivos.

Aos demais docentes do curso de mestrado em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Jr.**, **Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi**, **Prof. Dr. Mário Taba Jr.** e **Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza**, pelo convívio e pelos conhecimentos e experiências compartilhados desde o curso de especialização, que tanto contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Ao **Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira**, pela disposição e forma generosa com que sempre me atendeu, contribuindo de forma expressiva na realização deste trabalho.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade De São Paulo**, representada por seu diretor Prof. Dr. Osvaldo Luiz Bezzon, pela oportunidade de aprendizado.

À **Prof^a. Dr^a. Mamie Misusaki Iyomasa**, por disponibilizar o criostato.

Aos professores **Dr. Ricardo Della Coletta** e **Dr. Edgard Graner**, pela disponibilidade com a qual me receberam e por fornecer as células de melanoma murino.

A toda a **minha família**, meus avós, tios, tias, primos e primas, pelo carinho e incentivo, me ensinando a acreditar em mim. Em especial à minha **avó Isaura**, que me acolheu em minhas idas e vindas, à minha **madrinha Iraídes**, que sempre me apoiou em minha formação, e à **tia Ednalva**, pelos conselhos e exemplo.

Às minhas amigas, irmãs de coração, **Karen, Lú Garcia, Maíra, Manú, Marcela e Sâmia**, que desde a infância me acompanham em todos os momentos, pela amizade, afinidade, compreensão e confiança. Nossos planos e sonhos nos afastaram e privaram da convivência diária, mas a distância não muda em nada o sentimento que tenho por vocês.

À xuxuzada (**Ciça, Dani, Flor, Lê, Pam, Thá e Van**) e aos queridos **Jorge e Tanga**, pelos momentos maravilhosos que passamos juntos e por demonstrarem que amizades verdadeiras continuam a crescer mesmo a distância. As constantes conversas no MSN tornam meus dias mais alegres. Como é bom saber que sempre posso contar com vocês. Saudades sempre.

À **Ingrid e Karina**, que fizeram parte de tantos momentos importantes nesses dois anos, ajudando a suportar a distância da família e as dificuldades do curso. O comprometimento e a dedicação de vocês a tudo que fazem me fizeram crescer como pessoa. Obrigada pelo carinho, pelos cuidados, pela companhia e pela profunda e sincera amizade. Sentirei saudade de tudo que vivemos, e estarei sempre torcendo por vocês à distância.

Ao **Danilo**, pelo apoio no atendimento aos pacientes, pela confiança e amizade, e pelos muitos ensinamentos que me transmitiu.

Aos demais colegas da pós-graduação, **Dânia, Patrícia, Adriana, Flávia, Luciana Bastos, Priscila Nóbrega, Priscila Paganini, Guilherme, Patrícia Freitas, Rafael, Andrea, Carol e Janine**, por todo o carinho com que me receberam, pela companhia agradável, convivência harmoniosa e todo o apoio nesta trajetória.

Aos amigos do **Laboratório de Cultura de Células**, **Alice, Fabíola, Larissa Sverzut, Luciana “Pugi”, Luciana Sicchieri, Maidy, Glauce, Grasielle, Gabriela, Karen, Olívia e Will**, pelas diversas vezes em que me ajudaram e por me proporcionarem o melhor ambiente de trabalho. Agradeço especialmente à **Larissa de Castro**, ao **Lucas** e ao **Roger**, pela amizade, companheirismo, por tudo o que me ensinaram e toda a contribuição para a realização deste trabalho.

Aos amigos do mestrado em Cirurgia, **Gustavo, Marcelo, Michel, Patrício, Renan e Rogério**, pelos diversos momentos de descontração, sem os quais essa jornada não teria sido prazerosa.

Aos alunos de iniciação científica, **Felipe e Camila**, pela dedicação e colaboração nos trabalhos.

Aos **alunos da graduação**, que participaram diretamente da minha formação, com amizade, respeito, interesse e aprendizado, que tanto me motivaram.

Aos **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em especial ao **Aldo, Edson, Adriana, Tati, Dulce, Zilda, Sueli, Sebastião, Júnia, Regiane, Isabel** e ao **veterinário Fábio**, pela disposição com que me ajudaram durante a realização desta pesquisa, e, sobretudo, pelo carinho e amizade.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pelo apoio financeiro, e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, pela bolsa de mestrado concedida.

A todos que estiveram presentes e contribuíram, direta ou indiretamente, para o desenvolvimento e finalização deste trabalho,

Muito Obrigada!

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Processo de obtenção do tecido gengival. A) Área da maxila do cão, da qual foi removida a biópsia. B) Biópsia sendo removida com um punch de 2 mm. C) Tecido obtido após remoção com punch (epitélio + conjuntivo) 32
- Figura 2.** Cultura de fibroblastos. A) Fragmentos de tecido conjuntivo gengival em uma garrafa de 25 cm². B) Início da cultura, com fibroblastos se estendendo do explante. C) Fibroblastos em confluência. Barra = 100 µm 33
- Figura 3.** Cultura em tecido. A) MDA utilizada no experimento. B) MDA sendo dividida em fragmentos de 7 X 10 mm com lâmina de bisturi número 15. C) Fragmentos de MDA divididos. D) Placa de petri contendo 50 ml de solução salina estéril para hidratação da matriz. E) Placa de 24 poços contendo 6 fragmentos de MDA + células. F) Poço contendo MDA + células, em maior aumento 35

Figura 4. Epifluorescência de culturas de FGC (A, D e G), FGH (B, E e H) e B16F10 (C, F e I) cultivadas sobre MDA em 12 h (A, B e C), 7 (D, E e F) e 14 dias (G, H e I). Fluorescência verde revela o citoesqueleto de actina, e azul, núcleos celulares. Nota-se: em A, B e C, baixa densidade de células aderidas sobre a MDA em 12 h; em D e G, células FGC aderidas e espalhadas (cabeça de seta), mas distantes umas das outras (como evidenciado no detalhe em G); em E e H, células FGH formando uma monocamada celular na superfície da MDA (cabeça de seta e detalhe em H), sendo possível em H visualizar células no interior da matriz (cabeça de seta); em F e I, células B16F10 dispostas em aglomerados celulares (cabeça de seta); em I, observa-se também a presença de células em monocamada (cabeça de seta). Barra = 100 μm (A, B, C, D, E, G e H), 200 μm (F e I) e 50 μm (Detalhe).....41

Figura 5. Medida da viabilidade celular de fibroblastos de cão (FGC) e humano (FGH), expressa em absorbância em 7 e 14 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. A barra indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre FGC e FGH no mesmo tempo experimental.....43

Figura 6. Medida da viabilidade celular de fibroblastos de cão (FGC) cultivadas em meio condicionado (MC) e meio não condicionado (MNC), expressa em absorbância, em 24, 48 e 72 horas. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. A barra indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre culturas crescidas em MC e MNC, no mesmo tempo experimental.....44

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média do número total de células (FGC, FGH e B16F10) presentes na MDA, por corte, em 12 horas, 7 e 14 dias	42
Tabela 2 – Porcentagem (%) de células (FGC, FGH E B16F10) presentes na superfície (S) e interior (I) da matriz por corte, em 12 horas, 7 e 14 dias	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: grau Celsius

2D: bidimensional

3D: tridimensional

B16F10: linhagem celular B16F10 de melanoma murino

Cm: centímetro

D: dias

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

DMEM: Meio de Dulbecco modificado por Eagle

FGC: fibroblasto gengival de cão

FGH: fibroblasto gengival humano

h: hora

I: interior

MDA: matriz dérmica acelular

Min: minutos

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

OCT: composto de temperatura ótima de corte

PB: solução de fosfato tamponado

RPM: rotações por minuto

S: superfície

U/ mL: unidade por mililitro

µg/ mL: micrograma por mililitro

µl: microlitro

RESUMO

RESUMO

Maia LP. **Avaliação *in vitro* de matriz dérmica acelular como arcabouço tridimensional para cultivo de fibroblastos gengivais.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2010.

Introdução: Fibroblastos gengivais desempenham um importante papel na regeneração de tecidos moles de proteção do periodonto. Alloderm® (MDA) é um substituto alógeno muito utilizado e estudado em periodontia. O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, se a MDA é uma matriz tridimensional adequada, através de sua resposta à cultura de fibroblastos gengivais e células neoplásicas; e, ainda, se os subprodutos da MDA influenciam o comportamento celular. **Material e Métodos:** Fibroblastos gengivais de cão (FGC) e fibroblastos gengivais humanos (FGH) foram obtidos pela técnica do explante a partir de tecido conjuntivo gengival de, respectivamente, três indivíduos e três cães saudáveis. As células FGC, FGH e B16F10 de melanoma murino foram cultivadas sobre a MDA por até 14 dias. Os seguintes parâmetros foram avaliados: presença, morfologia e distribuição de FGC, FGH e B16F10 por fluorescência direta; viabilidade de FGC e FGH por MTT; e o efeito do meio de cultura condicionado (MC) em MDA por 24 h na viabilidade celular de FGC por MTT. Os dados quantitativos foram submetidos aos testes estatísticos Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparações múltiplas (nível de significância: 5%). **Resultados:** A epifluorescência revelou que, em 12 h, FGH e FGC estavam aderidos à superfície da MDA em baixa densidade celular, exibindo morfologia poligonal com núcleos esféricos, enquanto que, aos 7 e

14 dias, essas células apresentavam com formato alongado, núcleos ovalados e citoesqueleto de actina com fibras de estresse. Aos 7 e 14 dias, FGC apresentavam-se distribuídos de forma desigual sobre a MDA, formando uma camada celular descontínua, sem aumento no número de células entre os períodos; FGH formaram uma monocamada celular na superfície da MDA, estando presentes em maior número após 14 dias de cultivo ($p<0,05$); e B16F10 exibiram um aumento no número de células de 12 h para 7 dias ($p<0,05$), apresentando-se dispostas em aglomerados celulares, principalmente na superfície da MDA, com a formação de camada contínua aos 14 dias. Notou-se maior número de células nas amostras cultivadas com B16F10, seguido por FGH e FGC aos 7 dias ($p<0,05$). Aos 14 dias, FGH e B16F10 estavam presentes em maior número, com diferença estatística significativa em relação aos FGC ($p<0,05$). Foi observada maior porcentagem de células na superfície ($p<0,05$) do que no interior da MDA e essa proporção manteve-se estável durante os períodos avaliados para todos os tipos celulares. O ensaio de MTT indicou maior viabilidade celular nas amostras cultivadas com FGH comparado a FGC ($p=0,024$), aos 7 e 14 dias. Notou-se um decréscimo na viabilidade celular em culturas cultivadas em MC, com diferença estatística entre os grupos em 48 e 72 horas ($p<0,05$). **Conclusão:** Podemos concluir que fibroblastos gengivais e mesmo células altamente proliferativas, como B16F10, povoam apenas superficialmente a MDA e que FGC são afetados negativamente pelos subprodutos da MDA, reduzindo sua viabilidade.

Palavras-chave: Cultura de células, Engenharia de tecidos, Fibroblastos gengivais, Matriz dérmica acelular.

ABSTRACT

ABSTRACT

Maia LP. ***In vitro* evaluation of acellular dermal matrix as a three-dimensional scaffold for gingival fibroblasts seeding.** Thesis (Master) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2010.

Introduction: Gingival fibroblasts play a central role in oral soft tissue regeneration. Alloderm® (Alloderm® - ADM) is the most used and studied allogeneic substitute. The aim of this investigation was to verify if ADM is a suitable three-dimensional matrix, through its *in vitro* response to gingival fibroblasts and cancerous cells lineage and, also, if ADM end products affect cellular behavior. **Methods:** Canine gingival fibroblasts (CGF) and human gingival fibroblasts (HGF) cultures were established by the explant technique of gingival connective tissues of three dogs and three healthy patients, respectively. CGF, HGF and B16F10 cells of murine melanoma were seeded on ADM and grown for up to 14 days. The following parameters were assessed: presence, morphology and distribution of CGF, HGF e B16F10 by direct fluorescence; CGF and HGF viability by MTT; and the effect of culture medium conditioned (CM) in the MDA for 24 h on CGF viability by MTT. Quantitative data were submitted to Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests, followed by Dunn's method. **Results:** Epifluorescence revealed that CGF and HGF were adherent and exhibited a polygonal morphology at 12 h while at 7 and 14 days they were spread, exhibiting an elongated shape and the actin cytoskeleton assembled into stress fibers. CGF were unevenly distributed on ADM surface, showing no increase in cell number over the experimental periods; HGF formed a monolayer on

the ADM surface, in a higher number at 14 days ($p < 0.05$); B16F10 exhibited an increase in cell number in 7 days ($p < 0.05$), and were mainly arranged in cell aggregates on the ADM, forming a continuous layer at 14 days. A higher percentage of cells on the ADM surface ($p < 0.05$) compared to inside the matrix was observed for all cell types in all periods. MTT values indicated higher cell viability in samples cultured with HGF compared to CGF ($p = 0.024$). A significantly lower cell viability for CGF grown in CM compared to cells grown in non conditioned medium at 48 and 72 h ($p < 0.05$) was noticed. **Conclusion:** Gingival fibroblasts and even highly proliferative cells as B16F10 can be only superficially located on ADM and CGF are negatively affected by ADM end products, reducing its viability.

Key-words: Cell culture, Gingival fibroblasts, Tissue engineering, Acellular dermal matrix.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvi
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxii
1 INTRODUÇÃO	27
2 MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1 Cultura de células	32
2.1.1 <i>Fibroblastos gengivais de cão</i>	32
2.1.2 <i>Fibroblastos gengivais humanos</i>	34
2.1.3 <i>Melanoma murino</i>	34
2.2 Cultura de tecido	34
2.3 Morfologia e distribuição celular na MDA.....	36
2.4 Viabilidade celular	37
2.5 Viabilidade celular em meio de cultura condicionado em MDA.....	37
2.6 Análise estatística	38
3 RESULTADOS.....	40
3.1 Morfologia e distribuição celular na MDA.....	40
3.2 Viabilidade celular	43
3.3 Viabilidade celular em meio de cultura condicionado na MDA.....	44
4 DISCUSSÃO	46
5 CONCLUSÃO	54
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
APÊNDICE.....	62
ANEXO	82

1 INTRODUÇÃO

---

1 INTRODUÇÃO

A engenharia tecidual é um campo interdisciplinar que associa os princípios de engenharia e biologia no desenvolvimento de substitutos biológicos que visam manter, restaurar ou melhorar tecidos e funções perdidas^{1,2}. Na periodontia, a engenharia de tecidos diz respeito especificamente à regeneração do osso alveolar, cemento radicular, ligamento periodontal e tecidos moles de proteção².

Três caminhos têm sido explorados na criação de novos tecidos: a injeção de células isoladas, o desenvolvimento de sistemas encapsulados de transporte e o transplante de células em matrizes³. 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 adequado⁴. Procedimentos de engenharia que se baseiam no transplante de células em matrizes empregam matrizes extracelulares exógenas desenvolvidas para colocar os diferentes tipos celulares em contato, em um ambiente tridimensional (3D) adequado, além de fornecer suporte mecânico até que os tecidos recém-formados estejam estruturalmente estabilizados e os sinais específicos para orientar a expressão gênica de células que formam o tecido entrem em equilíbrio^{4,5}. 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 substitutos.

A origem das células para o cultivo *in vitro* é de grande importância para o desenvolvimento de substitutos orais para enxerto. Uma terapia baseada em células para a regeneração dos tecidos orais deve utilizar células autógenas, pois o sistema

imunológico do organismo hospedeiro pode destruir enxertos heterólogos ou xenólogos. 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 indutivos⁵.

Fibroblastos gengivais desempenham um importante papel na regeneração de tecidos moles de proteção do periodonto. Essas células aparecem no local de lesões em um estágio muito inicial e se proliferam rapidamente à medida que o processo de cicatrização progride. Elas aceleram o processo de cicatrização por meio do controle da deposição de matriz (colágeno tipos I e IV, elastina, laminina). Adicionalmente, fibroblastos sintetizam vários fatores de crescimento e citocinas que estimulam a cicatrização de feridas⁶.

Um material ideal para ser utilizado como matriz 3D no desenvolvimento de novos tecidos deve facilitar o transporte de células para locais específicos do organismo, além de definir e manter um espaço tridimensional para a formação de novos tecidos com estrutura adequada. A matriz deve fornecer integridade estrutural temporária suficiente até que o tecido neo-formado 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 facilitarão 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^{3,4}.

A cultura de fibroblastos gengivais em diferentes matrizes, incluindo substitutos de pele alógenos, tem sido estudada e tem demonstrado resultados promissores na regeneração de tecidos moles⁵⁻¹⁴. Alloderm®* (MDA) é o substituto alógeno mais utilizado e estudado em periodontia. Originalmente, MDA foi introduzida na medicina em cirurgias plásticas reconstrutivas, para o tratamento de vítimas de queimadura¹⁵, e atualmente também tem sido usado em cirurgias oftálmicas¹⁶ e plásticas¹⁷, neurocirurgia¹⁸ e otorrinolaringologia¹⁹. Na Odontologia, a MDA pode ser indicada em vários procedimentos periodontais, como recobrimento radicular²⁰⁻²⁸; aumento de tecido queratinizado ao redor de dentes e implantes^{25,29,30}; e procedimentos para preservação da espessura do rebordo alveolar^{31,32}.

A MDA constitui-se em um material dérmico acelular liofilizado e desepitelizado, obtido a partir de pele humana proveniente de bancos de tecidos por um processo cuidadosamente controlado que remove a epiderme e as células da derme, sem alterar a estrutura da matriz extracelular e membrana basal¹⁵. Supõe-se que o processo de descelularização diminui a possibilidade de transferência viral bem como elimina antígenos que causam rejeição³³. Após o processamento, a integridade ultra-estrutural da matriz é mantida. Baseado nisso, poder-se-ia esperar que o aloenxerto resultante, imunologicamente inerte, serviria como um arcabouço capaz de permitir a migração e adesão de células, como queratinócitos e fibroblastos, que repovoariam e incorporariam o material ao leito receptor^{25,29}.

No entanto, existem diferenças estruturais significantes entre MDA e 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-existent no enxerto³⁴. Devido a sua estrutura não vital, a MDA depende

---

* LifeCell Corporation, Branchburg, NJ

apenas de células e vasos sanguíneos do leito receptor para alcançar a reorganização³², o que leva a uma incorporação mais lenta^{35,36}. A incorporação mais lenta aos tecidos do hospedeiro pode resultar em deficiências estruturais e funcionais, já que as interações célula-célula apresentam uma importante influência na maturação celular⁶.

Com o intuito de solucionar essas dificuldades, culturas de células epiteliais (queratinócitos) e fibroblastos na MDA têm sido avaliadas, como uma alternativa de se alcançar uma cicatrização mais acelerada, melhorar a incorporação e diminuir a contração do material enxertado. No entanto, a eficiência da incorporação celular através da matriz ainda está sob investigação^{7,14,37}.

O isolamento de células, sua adesão e proliferação em substratos biodegradáveis são componentes importantes em projetos de engenharia tecidual. A pesquisa de novas alternativas que possam melhorar a incorporação de aloenxertos 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 MDA previamente à sua utilização deve ser considerada. Entretanto, são necessários estudos *in vitro* para avaliar o tempo e a complexidade desse procedimento e, sobretudo, o desenvolvimento celular nos tecidos. Estudos em modelo animal, envolvendo a cultura de células, e em especial fibroblastos gengivais em um arcabouço 3D permitirão avaliar a aplicabilidade do método.

O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, se a MDA é uma matriz tridimensional adequada, através de sua resposta à cultura de fibroblastos gengivais e células neoplásicas; e, ainda, se os subprodutos da MDA influenciam o comportamento celular.

2 MATERIAL E MÉTODOS

---

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultura de células

2.1.1 Fibroblastos gengivais de cão

Foram utilizados 3 cães, adultos jovens, de raça não definida, com aproximadamente 20 kg de peso. Os animais foram selecionados de acordo com os seguintes critérios: sem lesões orais e infecções fúngicas ou virais, e com boa saúde geral, sem envolvimento sistêmico. O tecido gengival dos cães foi obtido da região de caninos e pré-molares maxilares, removido com um punch de 2 mm de diâmetro da papila interdental dos cães, previamente sedados. FGC foram cultivados a partir da técnica do explante (Figura 1).

Figura 1. Processo de obtenção do tecido gengival. A) Área da maxila do cão, da qual foi removida a biópsia. B) Biópsia sendo removida com um punch de 2 mm. C) Tecido obtido após remoção com punch (epitélio + conjuntivo).

O tecido removido foi desepitelizado 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 312,5

[†] Corning Incorporated, NY, USA

[‡] Gibco Invitrogen, Gaithersburg, MD

ng/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 pedaços de aproximadamente 1 mm³ com lâmina cirúrgica e transferido para garrafas de 25 cm² contendo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino[§] e 250 ng/mL de vancomicina, 0.5 µg/mL de gentamicina e 50 ng/mL de fungizona. As culturas foram incubadas a 37°C e mantidas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂, e o meio foi trocado a cada 2-3 dias. Após confluência, os fibroblastos foram destacados das garrafas com solução de tripsina/EDTA a 0.05^{**}, seguido de inativação com meio de cultura. As células destacadas e inativadas foram centrifugadas por 3 min a 3000 rpm e o *pellet* formado foi ressuspensionado em novo meio de cultura e transferido para garrafas de 75 cm^{2††}. Células entre a primeira e segunda passagem foram cultivadas sobre a MDA na densidade de 4 x 10⁴ células por poço, por períodos de até 14 dias (Figura 2). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil (Protocolo nº. 06.1.634.53.8).

Figura 2. Cultura de fibroblastos. A) Fragmentos de tecido conjuntivo gengival em uma garrafa de 25 cm². B) Início da cultura, com fibroblastos se estendendo do explante. C) Fibroblastos em confluência. Barra = 100 µm.

[°] Nunc, Roskilde, Denmark

[§] Invitrogen, Carlsbad, USA

^{**} Gibco

^{††} Nunc

2.1.2 Fibroblastos gengivais humanos

Três indivíduos saudáveis foram selecionados para esse estudo, não fumantes, sem doenças sistêmicas e sem doença periodontal ou qualquer outra infecção bucal, que precisassem ser submetidos à cirurgia periodontal que envolvesse a remoção de tecido gengival saudável. Fibroblastos gengivais humanos (FGH) foram cultivados a partir da técnica do explante, da mesma forma que os FGC, descrito anteriormente. Células entre a primeira e segunda passagem foram cultivadas sobre a MDA na densidade de 4×10^4 células por poço, por períodos de até 14 dias. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo nº. 2007.1.1234.58.5).

2.1.3 Melanoma murino

A linhagem celular B16F10 de melanoma murino (B16F10) foi cultivada em meio RPMI 1640^{††} suplementado com 10% de soro fetal bovino^{§§} e 100 U/ml de Penicilina Estreptomicina^{***}, em garrafas de 75 cm^{2†††}. Uma vez atingida confluência, as células foram destacadas utilizando uma solução de EDTA a 1 mM e tripsina a 0,25%^{†††} e cultivados na densidade de 4×10^4 células por poço, por períodos de até 14 dias. Todos os experimentos foram realizados utilizando células entre a sétima e nona passagem. Durante o período de cultura as células foram incubadas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% CO₂, e o meio trocado a cada 2–3 dias.

2.2 Cultura de tecido

Primeiramente, seguindo as instruções do fabricante, a matriz foi recortada e lavada em solução salina estéril em placa de Petri por 15 min. Uma amostra de 20 x 40 mm foi dividida em fragmentos de aproximadamente 10 x 7 mm cada. Após

---

^{††} Gibco

^{§§} Invitrogen

^{***} Invitrogen

^{†††} Nunc

^{†††} Gibco

flutuar sobre o papel de transporte, o material foi transferido para um novo tubo contendo solução salina estéril e uma nova lavagem de 15 min foi realizada. As amostras foram posicionadas no fundo dos poços de placas de poliestireno de 24 poços, estabilizadas com grampos confeccionados a partir de fio ortodôntico, e as células foram plaqueadas sobre a MDA (Figura 3). Para monitorar se o crescimento celular estava adequado, em todos os experimentos as células foram também cultivadas em sistemas bidimensionais (2D), sobre poliestireno e Thermanox.

Figura 3. Cultura em tecido. A) MDA utilizada no experimento. B) MDA sendo dividida em fragmentos de 7 X 10 mm com lâmina de bisturi número 15. C) Fragmentos de MDA divididos. D) Placa de petri contendo 50 ml de solução salina estéril para hidratação da matriz. E) Placa de 24 poços contendo 6 fragmentos de MDA + células. F) Poço contendo MDA + células, em maior aumento.

2.3 Morfologia e distribuição celular na MDA

A morfologia e distribuição celular na MDA foram avaliadas através de fluorescência direta. Após 12 h, 7 e 14 dias, as amostras de MDA + célula foram removidas das placas, congeladas em gelo seco e montadas com um composto de temperatura ótima de corte^{§§§} (OCT, da sigla em inglês). Os fragmentos congelados foram recortados em criostato na espessura de 10 µm e adaptados em lâminas preparadas com poli-L-lisina^{****} a 0,1%. As amostras foram recortadas em três diferentes profundidades, da borda ao centro da matriz, sendo avaliados três cortes de cada área. Após serem lavadas em solução de fosfato tamponado (PB, da sigla em inglês), as lâminas contendo as amostras congeladas foram processadas para marcação de fluorescência. Resumidamente, as lâminas foram permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5% em PB por 10 min, seguido do bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por 30 min. Em seguida, procedeu-se à incubação com faloidina conjugada com Alexa fluor 488 (fluorescência verde, 1:200)^{††††}, por 60 min, em ambiente úmido e à temperatura ambiente, 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. Após montagem com meio de montagem *anti-fade*^{§§§§} as amostras foram analisadas utilizando microscópio de fluorescência sob epifluorescência^{*****}, utilizando microscópio de luz DMLB Leica^{†††††}, com objetivas N Plan (310/0.25, 320/0.40) e HCX PL Fluotar (340/0.75, 3100/1.3), acoplados com uma câmera digital Leica DC 300F. As imagens digitais adquiridas foram processadas utilizando o

---

§§§ Tissue-Tek OCT; Miles Inc., Elkhart, IN

**** Sigma

†††† Molecular Probes, Eugene, OR

†††† Molecular Probes

§§§§ Vectashield, Vector Labs, Burlingame, CA

***** Leica, Benstein, Germany

††††† Leica

software Adobe Photoshop^{†††††}. O número total de células e porcentagem de células na superfície e interior da matriz, por corte, foram determinados por meio de contagem nas amostras marcadas por fluorescência direta.

2.4 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada quantitativamente através do ensaio colorimétrico MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)^{§§§§§}. O MTT é um sal que é reduzido em cristais de formazan (de cor púrpura) por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis³⁸. Nos dias 7 e 14, as amostras cultivadas com FGC e FGH foram transferidas para novos poços e incubadas com MTT a 10% (5 mg/ml) em meio de cultura a 37°C por 4 horas. O meio foi então aspirado dos poços, e 1 ml de isopropanol ácido (HCl 0.04 N em isopropanol) foi adicionado a cada poço. As placas foram agitadas por 20 min e 150 µl da solução foi transferida para uma placa de 96 poços^{*****}. MDA sem células foi usada como controle negativo. A absorbância foi avaliada por meio de um espectrofotômetro µQuant^{†††††} utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Os dados foram expressos em absorbância.

2.5 Viabilidade celular em meio de cultura condicionado em MDA

Para verificar se os subprodutos da MDA influenciam o comportamento de FGC, o meio de cultura foi condicionado na MDA (MC) por 24 horas em atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂. Como controle, uma placa de 24 poços contendo apenas meio de cultura (meio não condicionado – MNC) foi mantida sob as mesmas

---

††††† Adobe Systems

§§§§§ Sigma, Invitrogen, Gaithersburg, MD

***** Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA

††††† Biotek, Winooski, VT

condições. FGC entre a primeira e segunda passagem foram plaqueados em uma placa de 24 poços no poliestireno, na densidade de 4×10^4 células por poço, no mesmo dia em que iniciou-se o processo de condicionamento do meio. Após o período de condicionamento, 500 µl de MC e MNC foram adicionados a cada poço contendo FGC. A viabilidade das culturas foi analisada pelo ensaio de MTT em 24, 48 e 72 horas após a exposição.

2.6 Análise estatística

Os dados apresentados neste trabalho são as médias dos resultados de três culturas realizadas separadamente para FGC e FGH, estabelecidas a partir de três cães e três pacientes diferentes. Para B16F10 foram utilizadas três culturas da mesma linhagem celular, realizadas separadamente. Os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$). Os dados foram comparados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes, quando comparados dois grupos, e Kruskal-Wallis, quando comparados três ou mais grupos independentes, seguido pelo Método de Dunn para comparações múltiplas (nível de significância: 5%).

3 RESULTADOS

---

3 RESULTADOS

3.1 Morfologia e distribuição celular na MDA

Ao final dos períodos de 12 h, 7 e 14 dias, as células cultivadas sobre a MDA foram submetidas à fluorescência direta para avaliação da presença e distribuição de células. A epifluorescência revelou que, em 12 h, fibroblastos, tanto de cão quanto humano, exibiam morfologia poligonal, com núcleos esféricos, enquanto que aos 7 e 14 dias, as células apresentavam-se com forma alongada, núcleos ovalados e citoesqueleto de actina com fibras de estresse (stress fibers). Em 12 h, notou-se a presença de células aderidas à superfície da MDA em baixa densidade, para todos os tipos celulares avaliados (Fig. 4A-C). Os FGC, aos 7 (Fig. 4D) e 14 dias (Fig. 4G), apresentavam-se distribuídos de forma desigual sobre a MDA, formando uma camada descontínua que deixava segmentos da superfície destituídos de células. Foram observados ainda, alguns cortes com ausência total de células. Nas culturas de FGH aos 7 dias (Fig. 4E) observou-se a formação de uma monocamada celular na superfície da MDA, a qual tornou-se confluenta aos 14 dias (Fig. 4H). Nas culturas de B16F10 as células apresentavam-se dispostas em aglomerados celulares, principalmente na superfície da MDA, aos 7 dias (Fig. 4F). Aos 14 dias, notou-se a formação de uma camada celular mais confluenta, contudo, ainda observava-se a formação de aglomerados celulares (Fig. 4I). Eram apenas ocasionais as células no interior da MDA, as quais eram observadas em áreas de menor densidade de fibras, próximas à superfície (Fig. 4H).

Figura 4. Epifluorescência de culturas de FGC (A, D e G), FGH (B, E e H) e B16F10 (C, F e I) cultivadas sobre MDA em 12 h (A, B e C), 7 (D, E e F) e 14 dias (G, H e I). Fluorescência verde revela o citoesqueleto de actina, e azul, núcleos celulares. Nota-se: em A, B e C, baixa densidade de células aderidas sobre a MDA em 12 h; em D e G, células FGC aderidas e espalhadas (cabeça de seta), mas distantes umas das outras (como evidenciado no detalhe em G); em E e H, células FGH formando uma monocamada celular na superfície da MDA (cabeça de seta e detalhe em H), sendo possível em H visualizar células no interior da matriz (cabeça de seta); em F e I, células B16F10 dispostas em aglomerados celulares (cabeça de seta); em I, observa-se também a presença de células em monocamada (cabeça de seta). Barra = 100 μ m (A, B, C, D, E, G e H), 200 μ m (F e I) e 50 μ m (Detalhe).

O número de células presentes na matriz por corte foi determinado por meio de contagem, por epifluorescência. A tabela 1 mostra a média do número de células presentes nos cortes da matriz cultivada com os diferentes tipos celulares, nos períodos avaliados. Nas amostras cultivadas com FGC, não houve diferença no número de células presentes na matriz entre os períodos avaliados. FGH estavam presentes em maior número na matriz após 14 dias quando comparado a 12 horas e

7 dias, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Nas amostras cultivadas com B16F10 houve um aumento no número de células presentes na matriz de 12 horas para 7 dias ($p < 0,05$), sem diferença estatística significativa entre 7 e 14 dias. Comparando os diferentes tipos celulares em cada período, observou-se maior número de células nas amostras cultivadas com B16F10, seguido por FGH e FGC aos 7 dias ($p < 0,05$). Aos 14 dias, FGH e B16F10 estavam presentes em maior número, com diferença estatística significativa em relação aos FGC ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística significativa entre FGH e B16F10 aos 14 dias.

Tabela 1 – Média do número total de células (FGC, FGH e B16F10) presentes na MDA, por corte, em 12 horas, 7 e 14 dias.

	FGC	FGH	B16F10
12 h	$11,2 \pm 5,5^{ab}$	$16,5 \pm 10,7^{ab}$	$6,6 \pm 4^a$
7 d	$11,1 \pm 15,7^a$	$37,4 \pm 30,5^b$	$213,7 \pm 165,2^c$
14 d	$20,8 \pm 30,6^{ab}$	$165,9 \pm 95,6^c$	$237,2 \pm 101,2^c$

FGC: fibroblasto gengival de cão; FGH: fibroblasto gengival humano; B16F10: melanoma murino. Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão (mediana); letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa intra e intergrupos ($p < 0,05$).

A tabela 2 mostra a média da porcentagem de células presentes na superfície (S) e interior (I) da matriz por corte em 12 horas, 7 e 14 dias, considerando apenas os cortes que apresentavam célula. Foi observada maior porcentagem de células na superfície ($p < 0,05$) do que no interior da matriz para todos os tipos celulares, em todos os períodos avaliados. Essa proporção manteve-se estável durante os tempos experimentais em todos os tipos celulares.

Tabela 2 – Porcentagem (%) de células (FGC, FGH E B16F10) presentes na superfície (S) e interior (I) da matriz por corte, em 12 horas, 7 e 14 dias.

	FGC			FGH			B16F10		
	12 h	7 d	14 d	12 h	7 d	14 d	12 h	7 d	14 d
S	100±0 ^a	92,3±10,2 ^a	97,5±2,8 ^a	100±0 ^a	96,5±5,6 ^a	86,6±13,2 ^a	96,3±10,2 ^a	97,3±7,9 ^a	95,6±7,7 ^a
I	0±0 ^b	7,7±10,2 ^b	2,4±2,8 ^b	0±0 ^b	3,5±5,6 ^b	13,4±13,2 ^b	3,7±10,2 ^b	2,6±7,9 ^b	4,3±7,7 ^b

FGC: fibroblasto gengival de cão; FGH: fibroblasto gengival humano; B16F10: melanoma murino.

Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn.

Os dados estão apresentados em porcentagem (%) como média ± desvio padrão; letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa intra-grupo e intergrupos ($p < 0,05$).

3.2 Viabilidade celular

O ensaio de MTT, comparando a viabilidade celular entre FGC e FGH cultivados na MDA, aos 7 e 14 dias, indicou maior viabilidade celular nas amostras cultivadas com FGH, nos dois períodos avaliados ($p = 0,024$) (Figura 5).

Figura 5. Medida da viabilidade celular de fibroblastos de cão (FGC) e humano (FGH), determinada pelo ensaio colorimétrico MTT, expressa em absorbância em 7 e 14 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. A barra indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre FGC e FGH no mesmo tempo experimental.

3.3 Viabilidade celular em meio de cultura condicionado na MDA

Avaliando o efeito do meio de cultura condicionado na MDA (MC) por 24 horas sobre a viabilidade celular de FGC, o ensaio de MTT indicou menor viabilidade celular em culturas cultivadas em MC, quando comparado às culturas crescidas em MNC em todos os tempos, com diferença estatística entre os grupos nos períodos de 48 e 72 horas ($p < 0,05$) (Figura 6).

Figura 6. Medida da viabilidade celular de fibroblastos de cão (FGC) cultivadas em meio condicionado (MC) e meio não condicionado (MNC), determinada pelo ensaio colorimétrico MTT, expressa em absorbância, em 24, 48 e 72 horas. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. A barra indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre culturas crescidas em MC e MNC, no mesmo tempo experimental.

4 DISCUSSÃO

---

4 DISCUSSÃO

A bioengenharia de tecidos representa importante avanço para medicina regenerativa. A literatura periodontal já apresenta relatos com uso de técnicas de engenharia tecidual que envolvem o crescimento de células autógenas em diferentes arcabouços, para serem usados com substitutos a enxertos autógenos^{8,9,37}. Estudos em modelo animal, envolvendo o cultivo de fibroblastos gengivais na MDA permitem avaliar a aplicabilidade do método. Por ser o cão nosso modelo experimental para estudos histomorfométricos, a intenção aqui foi avaliar a condição *in vitro* de fibroblastos caninos antes de propor um estudo para verificação do desempenho dessas células em sistemas 3D *in vivo*.

No presente estudo, a invasão celular em MDA de FGC foi comparada a FGH e células B16F10 de melanoma murino, células altamente proliferativas³⁹. Procurou-se também comparar a viabilidade dessas células aos fibroblastos humanos e ainda verificar se o meio condicionado na MDA poderia interferir no comportamento celular. Até os 14 dias de cultura FGC estavam aderidos e espreiados em baixa densidade, dispersos sobre a superfície externa da MDA, sendo apenas ocasional a presença de células em seu interior. A viabilidade celular de FGC foi significativamente menor em comparação aos FGH. Pode ser verificado ainda que o meio condicionado na MDA diminui gradativamente a viabilidade celular, mostrando que algum componente liberado pela MDA altera, de forma significativa, o desempenho celular, reduzindo a viabilidade celular.

A escolha da MDA para ser o carreador de fibroblastos gengivais partiu do princípio de essa matriz exibir um aspecto tridimensional propício para ser conduzido

implantado no hospedeiro. Além disso, a manutenção da arquitetura da derme durante o processo de preparação desse material facilitaria a penetração de células. A MDA já demonstrou ter uma boa incorporação aos tecidos do hospedeiro³¹ *in vivo* e apresenta resultados clínicos favoráveis em procedimentos para aumento de tecido gengival^{21-26,29,30}. Muitos estudos foram realizados para avaliar a eficácia da MDA como enxerto subepitelial, comparado ao enxerto de tecido conjuntivo subepitelial autógeno, com resultados similares entre as duas técnicas com relação a recobrimento radicular^{23,25,35,36} e espessura gengival⁴⁰. No entanto, na maioria dos estudos, enxerto autógenos resultam em um aumento significativamente maior de gengiva queratinizada e ganho de inserção^{25,35}, bem como menor tempo de cicatrização^{26,35,40}. Assim, com a incorporação de células autógenas, poder-se-ia otimizar e reduzir o tempo de incorporação da MDA, permitindo melhores resultados clínicos.

Alguns estudos avaliaram o cultivo de fibroblastos na MDA, apresentando resultados promissores. Um estudo preliminar³⁷ verificou que a adição de fibroblastos à matriz melhora a vascularização *in vivo*, em estágios iniciais de cicatrização. Naquele experimento, no entanto, a MDA foi colocada em contato com as células próximas ao explante – portanto, em estágio inicial de cultivo, e não foram realizados experimentos *in vitro* que confirmassem a efetividade do cultivo celular. No presente estudo, foi necessária uma grande quantidade de células em cada repetição. Assim, ainda que em passagens iniciais, as células precisaram ser replicadas para possibilitar a realização dos experimentos. Estudos avaliando características morfológicas e funcionais de FGH utilizaram células até a décima passagem, sem observar diferenças significantes entre as passagens^{41,42}. Contudo, em avaliações realizadas paralelamente ao presente estudo em nosso laboratório,

foi observada uma redução significativa na adesão, proliferação e viabilidade de FGC já na primeira passagem, comparada à subcultura (dados ainda não publicados).

Izumi et al.⁷, em um estudo clínico em humanos, comparou o enxerto de MDA e MDA + queratinócitos após tratamento de lesões pré-malignas e cancerosas, e observaram revascularização precoce, redução na resposta inflamatória e cobertura epitelial mais rápida nas áreas em que MDA + queratinócitos foi utilizada. Porém, em um estudo anterior *in vitro*¹⁴, o mesmo grupo não observou evidência de invasão celular na matriz.

Mais recentemente, Jhaveri et al.⁴³ avaliaram o uso de MDA cultivada com fibroblastos gengivais autógenos no tratamento de retrações gengivais, comparado ao enxerto de tecido conjuntivo autógeno subepitelial. Não foram observadas diferenças significantes quanto ao recobrimento radicular e aumento de tecido queratinizado. Porém, apesar de os autores confirmarem a presença de células aderidas à matriz, a distribuição interna dessas células na mesma não foi avaliada.

Apesar de a literatura apresentar resultados clínicos promissores no uso de MDA cultivada com fibroblastos gengivais autógenos, ainda não foram realizados estudos *in vitro* suficientes que comprovem o papel desempenhado pelas células cultivadas e que a MDA é realmente uma matriz ideal para ser utilizada como arcabouço em procedimentos de cultura 3D.

O estudo da morfologia celular por epifluorescência revelou a presença de FGC aderidos e espalhados, dispersos sobre a MDA enquanto que nas amostras cultivadas com FGH e B16F10, já foi observada a disposição de células em monocamada na superfície da MDA. Os fibroblastos, tanto de cão quanto humano, apresentavam citoesqueleto de actina organizado em fibras de estresse. A não

formação de uma monocamada por células fibroblásticas de cão provavelmente se deve a baixa densidade dessas células aderidas à MDA.

No entanto, a contagem de células por epifluorescência indicou que, mesmo para as culturas de FGH e B16F10, as quais exibiram maior densidade de células aderidas à MDA, não houve expressiva migração celular para o interior da MDA. A proporção de células na superfície e interior da MDA foi semelhante para todos os tipos celulares, nos tempos avaliados. Resultados semelhantes foram relatados por Erdag e Sheridan⁶, que usaram derme humana produzida segundo os mesmos princípios da MDA, Yamada et al.⁸, que usaram uma esponja de colágeno, e Izumi et al.¹⁴, que avaliaram o cultivo de queratinócitos orais na MDA.

Os fibroblastos sofrem inibição de crescimento por contato, o que poderia dificultar a migração dessas células para o interior da matriz ou mesmo levar à apoptose^{45,46}. Isso poderia explicar a ausência de FGH no interior da matriz. O mesmo não acontece com células metastáticas de melanoma murino (B16F10), e também não aconteceu com FGC, que se apresentavam dispersos sobre a matriz, sem contato direto entre as células.

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 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 matriz extracelular^{9,47}. São observadas ainda diferenças nas capacidades proliferativa e biosintética, atribuídas às interações célula-matriz, que levam à liberação de sinais químicos e mecânicos específicos^{9,48}. Além disso, em uma matriz de colágeno com características ideais para cultivo celular, fibroblastos

são capazes de causar, através de sua atividade migratória, a remodelação da matriz^{48,49}. Entretanto, as interações entre células fibroblásticas e matrizes colágenas são determinadas em parte pelo estado de tensão célula-matriz, controlado por diversos parâmetros, que incluem a densidade do colágeno e resistência da matriz. Em altas tensões célula-matriz, fibroblastos exibem fibras de estresse e adesões focais, lembrando as características observadas em culturas sobre superfícies recobertas com colágeno (2D)⁵⁰.

A literatura disponibiliza alguns trabalhos nos quais foi observada a invasão de células fibroblásticas em matrizes 3D. Hillmann et al.⁹, avaliando o cultivo 3D de fibroblastos gengivais em um sistema de transporte celular de poliéster, relataram a presença de multicamadas de células na superfície e uma densidade celular semelhante em áreas marginais e no centro da matriz. Ojeh et al.⁴⁴, observaram a migração de células até à metade da profundidade total de um dermal equivalente composto de colágeno e glicosaminoglicana, em 14 dias. Moscato et al.⁵¹ demonstraram a presença de fibroblastos espalhados sobre e no interior de uma matriz constituída de álcool polivinil e gelatina.

Hillmann et al.⁵, observaram ainda 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. As fibras colágenas da MDA apresentam-se arranjadas de forma muito densa, o que parece ser um fator limitante para que ocorra uma distribuição celular homogênea e o estabelecimento de uma estrutura semelhante a um tecido *in vitro*, e, desta forma, as células ficam restritas à superfície da matriz. A baixa porosidade e a baixa interconectividade dos poros na MDA pode dificultar a difusão de nutrientes, inviabilizando o crescimento das células *in vitro*, tanto em sua superfície quanto em

seu interior. Possivelmente, para a engenharia tecidual, a escolha de tecidos mais frouxos, com arranjo menos denso das fibras colágenas permitiriam a migração homogênea de células por toda a MDA, possibilitando uma matriz mais favorável para o transporte de células.

Além da menor densidade celular observada no estudo de morfologia por epifluorescência, o ensaio MTT indicou menor viabilidade celular nas amostras cultivadas com FGC, quando comparado às amostras cultivadas com FGH. Foi observado ainda que o meio de cultura condicionado na MDA diminui a viabilidade de FGC cultivados no poliestireno. Entretanto, não foi possível determinar qual ou quais fatores estariam interferindo na interação célula-matriz. Uma hipótese poderia ser a presença de quantidades indeterminadas de antibióticos (gentamicina, cefoxitina, lincomicina, polimixina B e vancomicina) na matriz. Em determinadas concentrações alguns antibióticos podem ser prejudiciais ao crescimento celular^{52,53}. Devido à constante contaminação bacteriana em culturas celulares, antibióticos são adicionados ao meio de cultura rotineiramente, principalmente quando as culturas são estabelecidas a partir de tecidos contaminados. Os antibióticos do meio, somados àqueles presentes na própria matriz podem gerar efeitos tóxicos à cultura de fibroblastos gengivais de cão.

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 ou cada cão, já que os dados representam a média dos resultados obtidos no cultivo de células de 3 indivíduos e 3 cães diferentes. No entanto, mesmo as amostras cultivadas com a linhagem celular (B16F10) apresentaram variação entre os três experimentos,

mostrando ainda que diferenças na obtenção da matriz podem interferir nos resultados.

É importante ressaltar que achados *in vitro* apresentam limitações quando extrapolados para o *in vivo*. Enquanto *in vitro* as células agem de forma isolada sobre a matriz, *in vivo* uma série de mecanismos relacionados ao hospedeiro, que resultam na liberação de moléculas sinalizadoras da resposta inflamatória e fatores de crescimento, colaboram para a invasão celular e incorporação do material.

5 CONCLUSÃO

---

5 CONCLUSÃO

Podemos concluir que fibroblastos gengivais e mesmo células altamente proliferativas, como B16F10, povoam apenas superficialmente a MDA e que FGC são afetados negativamente pelos subprodutos da MDA, reduzindo sua viabilidade.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sipe JD, Kelley CA, McNichol LA. Reparative medicine: growing tissues and organs. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;961:1-389.
2. Taba M, Jr., Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV. Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod Craniofac Res.* 2005;8:292-302.
3. Vacanti JP, Langer R, Upton J, Marler JJ. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998;33:165-182.
4. Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 1998;16:224-30.
5. 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.
6. Erdag G, Sheridan RL. Fibroblasts improve performance of cultured composite skin substitutes on athymic mice. *Burns.* 2004;30:322-8.
7. 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;32:188-97.
8. Yamada K, Yamaura J, Katoh M, Hata K, Okuda K, Yoshie H. Fabrication of cultured oral gingiva by tissue engineering techniques without materials of animal origin. *J Periodontol.* 2006;77:672-7.
9. 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 (Pt 17):2823-32.
10. Ng KW, Khor HL, Hutmacher DW. In vitro characterization of natural and synthetic dermal matrices cultured with human dermal fibroblasts. *Biomaterials.* 2004;25:2807-18.
11. Luitaud C, Laflamme C, Semlali A, et al. Development of an engineering autologous palatal mucosa-like tissue for potential clinical applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;83:554-61.

12. 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;79:1847-56.
13. Zhang X, Deng Z, Wang H, et al. Expansion and delivery of human fibroblasts on micronized acellular dermal matrix for skin regeneration. *Biomaterials*. 2009;30:2666-74.
14. Izumi K, Terashi H, Marcelo CL, Feinberg SE. Development and characterization of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent produced in a serum-free culture system. *J Dent Res*. 2000;79:798-805.
15. Wainwright DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns*. 1995;21:243-8.
16. Shorr N, Perry JD, Goldberg RA, Hoenig J, Shorr J. The safety and applications of acellular human dermal allograft in ophthalmic plastic and reconstructive surgery: a preliminary report. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 2000;16:223-30.
17. Tobin HA, Karas ND. Lip augmentation using an alloderm graft. *J Oral Maxillofac Surg*. 1998;56:722-7.
18. Barret JP, Dziewulski P, McCauley RL, Herndon DN, Desai MH. Dural reconstruction of a class IV calvarial burn with decellularized human dermis. *Burns*. 1999;25:459-62.
19. McFeely WJ, Jr., Bojrab DI, Kartush JM. Tympanic membrane perforation repair using AlloDerm. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000;123:17-21.
20. Nunez J, Caffesse R, Vignoletti F, Guerra F, San Roman F, Sanz M. Clinical and histological evaluation of an acellular dermal matrix allograft in combination with the coronally advanced flap in the treatment of Miller class I recession defects: an experimental study in the mini-pig. *J Clin Periodontol*. 2009;36:523-31.
21. Barros RR, Novaes AB, Jr., Grisi MF, Souza SL, Taba M, Jr., Palioto DB. New surgical approach for root coverage of localized gingival recession with acellular dermal matrix: a 12-month comparative clinical study. *J Esthet Restor Dent*. 2005;17:156-64; discussion 164.
22. 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;75:1350-6.

23. Harris RJ. Root coverage with a connective tissue with partial thickness double pedicle graft and an acellular dermal matrix graft: a clinical and histological evaluation of a case report. *J Periodontol*. 1998;69:1305-11.
24. Harris RJ. A comparative study of root coverage obtained with an acellular dermal matrix versus a connective tissue graft: results of 107 recession defects in 50 consecutively treated patients. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2000;20:51-9.
25. Novaes AB, Jr., Grisi DC, Molina GO, Souza SL, Taba M, Jr., Grisi MF. 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;72:1477-84.
26. Tal H. Subgingival acellular dermal matrix allograft for the treatment of gingival recession: a case report. *J Periodontol*. 1999;70:1118-24.
27. de Souza SL, Novaes AB, Jr., Grisi DC, Taba M, Jr., Grisi MF, de Andrade PF. Comparative clinical study of a subepithelial connective tissue graft and acellular dermal matrix graft for the treatment of gingival recessions: six- to 12-month changes. *J Int Acad Periodontol*. 2008;10:87-94.
28. Felipe ME, Andrade PF, Grisi MF, et al. Comparison of two surgical procedures for use of the acellular dermal matrix graft in the treatment of gingival recessions: a randomized controlled clinical study. *J Periodontol*. 2007;78:1209-17.
29. Scarano A, Barros RR, Iezzi G, Piattelli A, Novaes AB, Jr. Acellular dermal matrix graft for gingival augmentation: a preliminary clinical, histologic, and ultrastructural evaluation. *J Periodontol*. 2009;80:253-9.
30. Yan JJ, Tsai AY, Wong MY, Hou LT. Comparison of acellular dermal graft and palatal autograft in the reconstruction of keratinized gingiva around dental implants: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2006;26:287-92.
31. Luczyszyn SM, Grisi MF, Novaes AB, Jr., Palioto DB, Souza SL, Taba M, Jr. Histologic analysis of the acellular dermal matrix graft incorporation process: a pilot study in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2007;27:341-7.
32. 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 of treatment. *J Periodontol*. 2001;72:265-73.
33. Ward BB, Feinberg SE, Friedman CD. Tissue matrices for soft tissue and mucosal augmentation and replacement. *Facial Plast Surg*. 2002;18:3-11.

34. Janson WA, Ruben MP, Kramer GM, Bloom AA, Turner H. Development of the blood supply to split-thickness free gingival autografts. *J Periodontol.* 1969;40:707-16.
35. Wei PC, Laurell L, Geivelis M, Lingen MW, Maddalozzo D. Acellular dermal matrix allografts to achieve increased attached gingiva. Part 1. A clinical study. *J Periodontol.* 2000;71:1297-305.
36. Paolantonio M, di Murro C, Cattabriga A, Cattabriga M. Subpedicle connective tissue graft versus free gingival graft in the coverage of exposed root surfaces. A 5-year clinical study. *J Clin Periodontol.* 1997;24:51-6.
37. 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;78:296-303.
38. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.
39. Vayssade M, Sengkhamparn N, Verhoef R, et al. Antiproliferative and proapoptotic actions of okra pectin on B16F10 melanoma cells. *Phytother Res.* 2009;
40. Paolantonio M, Dolci M, Esposito P, et al. Subpedicle acellular dermal matrix graft and autogenous connective tissue graft in the treatment of gingival recessions: a comparative 1-year clinical study. *J Periodontol.* 2002;73:1299-307.
41. Palioto DB, Della Coletta R, Martelli Junior H, Joly JC, Graner E, de Lima AF. [Comparison between gingival and periodontal ligament fibroblasts from the same subject]. *Pesqui Odontol Bras.* 2002;16:319-25.
42. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res.* 1988;67:66-70.
43. 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.* 1-12. Posted online on 3 December 2009.
44. Ojeh NO, Frame JD, Navsaria HA. In vitro characterization of an artificial dermal scaffold. *Tissue Eng.* 2001;7:457-72.
45. Holley RW. Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature.* 1975;258:487-90.

46. Ruoslahti E, Obrink B. Common principles in cell adhesion. *Exp Cell Res.* 1996;227:1-11.
47. Croce MA, Silvestri C, Guerra D, et al. Adhesion and proliferation of human dermal fibroblasts on collagen matrix. *J Biomater Appl.* 2004;18:209-22.
48. Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol.* 2003;13:264-9.
49. Bell E, Ivarsson 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 U S A.* 1979;76:1274-8.
50. Rhee S, Grinnell F. Fibroblast mechanics in 3D collagen matrices. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59:1299-305.
51. Moscato S, Mattii L, D'Alessandro D, et al. Interaction of human gingival fibroblasts with PVA/gelatine sponges. *Micron.* 2008;39:569-79.
52. Goetz IE, Moglebust R, Warren CJ. Effects of some antibiotics on the growth of human diploid skin fibroblasts in cell culture. *In Vitro.* 1979;15:114-9.
53. Byarugaba W, Rudiger HW, Koske-Westphal T, Wohler W, Passarge E. Toxicity of antibiotics on cultured human skin fibroblasts. *Humangenetik.* 1975;28:263-7.

APÊNDICE

APÊNDICE

Apêndice A – Artigo em inglês

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

Luciana Prado Maia* DDS; 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 Bucco-Maxillo-Facial 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

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

Number of figures and tables: 5

Running title: **Evaluation of acellular dermal matrix as a 3D scaffold.**

Summary: Gingival fibroblasts and even highly proliferative cells as B16F10 can be only superficially located on ADM.

ABSTRACT

Background: The aim of this investigation was to verify if ADM is a suitable three-dimensional matrix, through its in vitro response to gingival fibroblasts and cancerous cells, also, if ADM end products affect cellular behavior. **Methods:** Canine gingival fibroblasts (CGF), human gingival fibroblasts (HGF) and murine melanoma cell line (B16F10) were seeded on ADM and grown for periods up to 14 days. The following parameters were assessed: morphology and distribution of CGF, HGF and B16F10; CGF and HGF viability and the effect of ADM conditioned medium (CM) on CGF viability. **Results:** Epifluorescence revealed that CGF were unevenly distributed on ADM surface, showing no increase in cell number over the experimental periods; HGF formed a monolayer on ADM surface, in a higher number at 14 days ($p < 0.05$); and B16F10 exhibited an increase in cell number in 7 days ($p < 0.05$), and were mainly arranged in cell aggregates on ADM, forming a continuous layer at 14 days. A higher percentage of cells on the ADM surface ($p < 0.05$) compared to inside the matrix was observed for all cell types, in all periods. MTT values indicated higher cell viability in samples cultured with HGF compared to CGF ($p = 0.024$). A significantly lower cell viability for CGF grown in CM compared to cells grown in non conditioned medium was observed at 48 and 72 h ($p < 0.05$). **Conclusion:** Gingival fibroblasts and even highly proliferative cells as B16F10 can be only superficially located on ADM and CGF are negatively affected by ADM end products, reducing its viability.

Key words: acellular dermal matrix, fibroblasts, three-dimensional culture, tissue engineering.

INTRODUCTION

Tissue engineering is an emerging interdisciplinary field that applies the principles of engineering and life sciences in the development of biological substitutes that aim to maintain, restore, or improve tissues and function^{1,2}. Cell transplantation in matrices has been explored as one way to create new tissues³. The technique employs exogenous three-dimensional (3D) extracellular matrices that function as a scaffold designed to guide the cells to specific sites in the body in order to: maintain the architecture for the formation of new tissues; to provide temporary mechanical support sufficient to withstand *in vivo* forces until the engineered tissue has sufficient mechanical integrity to support itself; to maintain distances between parenchymal cells that allow diffusion of gas and nutrients and, possibly, the ingrowth of vasculature from the host bed^{3,4}.

Cell culture into different matrices, including allogeneic skin substitutes, has been studied and has shown promising results in the regeneration of soft tissues⁵⁻¹⁴. Alloderm®^{*****} (ADM) is likely the most utilized and studied of the allogeneic subcutaneous substitutes. It is a freeze-dried, deepithelialized, acellular dermal graft processed from tissue-banked skin by a carefully controlled process that removes the epidermis and the cells from the dermis without altering the extracellular matrix structure and the basement membrane complex¹⁵. After processing, the ultrastructural integrity of the extracellular matrix is maintained. Based on this, it could be expected that the resulting allograft may serve as an architectural framework to support cells migration and adhesion, and thus provide faster repopulation and incorporation of the material at healing sites^{16,17}.

However, there are significant structural differences between ADM and autogenous grafts. The healing and revascularization of an autograft are based on the anastomoses between blood vessels of the gingival corium and those pre-existing in the graft¹⁸. Due to its

---

^{*****} LifeCell Corporation, Branchburg, NJ

non-vital structure, ADM depends on cells and blood vessels from the recipient site to achieve reorganization¹⁹, which leads to a slower incorporation^{20,21}., that could ultimately result in structural and functional deficiencies. In an attempt to reduce these difficulties, cultures of keratinocytes and fibroblasts on the ADM has been investigated as an alternative to achieve early wound healing, improve incorporation, and decrease wound contraction^{5,14,22,23}. However, the efficiency of cell incorporation throughout the matrix is still under investigation.

The source of the cells for in vitro culture is very important for the development of cell hybrid matrices. Gingival fibroblasts play a central role in oral soft tissue regeneration. These cells appear at the injury site at a very early stage and proliferate rapidly as wound healing progresses. They accelerate the healing process by regulation of matrix deposition (type I, type IV collagen, elastin, laminin). In addition, fibroblasts synthesize various growth factors and cytokines that stimulate wound healing⁸.

The cells isolation, their adhesion and proliferation in biodegradable scaffolds are important components for tissue engineering projects. Researches on new alternatives to improve allograft incorporation and reduce healing time on soft tissue reconstruction or tissue augmentation in the mouth are still limited. The possibility of seeding autogenous cells on ADM before use in surgical sites must be considered. However, in vitro studies are needed to verify if the time and complexity of this procedure is worthwhile. Studies in animal models, involving cell culture in a 3D scaffold, allow assessing the applicability of the method.

The aim of this investigation was to verify if ADM is a suitable three-dimensional matrix, through its in vitro response to gingival fibroblasts and, also, if ADM end products affect cellular behavior.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Canine gingival fibroblasts

Three young adults dogs, of mixed breed, about 20 kg, without oral lesions and viral or fungal infections and having good general health without systemic involvement, were used in these study. CGF were established from healthy keratinized gingiva from the maxilla of the dogs by explant techniques, as described previously by Novaes et al²³. Briefly, after removal of the epithelium, tissues were washed and sliced into pieces of about 1 mm³ and transferred to 25 cm² flasks^{§§§§§§}, with Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)^{*****} supplemented with 10% fetal bovine serum^{††††††††} and 250 ng/mL of vancomycin, 0.5 µL/mL of gentamicin and 50 ng/mL of fungisone. Cultures were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and the medium was changed every 2-3 days. When confluent, cells surrounding the explants were harvested using a solution of trypsin and ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA) at 0.05%^{††††††††} and transferred to 75 cm² flasks^{§§§§§§§§}. Cells between passages 1–2 were used. All procedures were approved by the Institutional Animal Research Committee (Protocol n°. 06.1.634.53.8).

Human gingival fibroblasts

Three non-smokers, systemically and periodontally healthy individuals which needed to be submitted to periodontal surgery involving healthy gingival tissue removal were selected for the study. HGF were established by explant techniques, in the same way as CGF, described previously. Cells between passages 1–2 were used. Protocol was approved by the Institutional Committee of Ethics in Research (Protocol n°. 2007.1.1234.58.5).

---

§§§§§§ Nunc, Roskilde, Denmark

***** Gibco Invitrogen, Gaithersburg, MD

†††††††† FBS, Hyclone, UT

†††††††† Gibco, Gaithersburg, MD

§§§§§§§§ Nunc, Roskilde, Denmark

Murine melanoma

Murine melanoma cell line B16F10 was cultured in RPMI medium 1640^{*****} supplemented with 10% fetal bovine serum^{††††††††} and 100 U/ml of Penicillin Streptomycin^{‡‡‡‡‡‡‡‡}, in 75 cm² flasks^{§§§§§§§§}. Once they reached confluence, cells were harvested using a 0.25% EDTA/trypsin solution^{*****} and cultured on ADM. All experiments were carried out using cells between passages 7-9. During the culture period, cells were incubated at 37° C in a humidified atmosphere of 5% CO₂, and the medium was changed every 2–3 days.

Tissue Culture

Primarily, following manufacturer instructions, the ADM were cut and washed with 50 mL of sterile saline solution in a petri dish for 15 minutes. A specimen of 20 X 40 mm was sliced into pieces of approximately 10 X 7 mm each. After flotation of the protect paper, ADM was transferred to a new solution and this procedure was repeated. Before use they were adapted in the bottom of a well in a 24-well-plate, stabilized with staples made from orthodontic wire. Cells were seeded at a density of 4 X 10⁴ cell / well and grown for periods up to 14 days. To monitor if the cell growth was appropriate in all experiments the cells were also grown, on polystyrene and Thermanox.

Cell morphology and distribution on ADM

Cell morphology and distribution over the ADM was assayed by direct fluorescence at 12 hours, 7 and 14 days. ADM + cells specimens were removed from the well-plates, frozen

---

***** Gibco, Gaithersburg, MD

†††††††† FBS, Hyclone, UT

‡‡‡‡‡‡‡‡ Invitrogen

§§§§§§§§ Nunc, Roskilde, Denmark

***** Gibco BRL

on dry ice and mounted using Optimal Cutting Temperature (OCT) compound^{††††††††}. Frozen specimens were sectioned at 10 µm in a cryostat and the semi-serial sections adapted on glass slides prepared with ply-L-lysine^{††††††††}. Frozen specimens were sliced into three different depth, from border to center, and three slices of each area where evaluated. After being washed in buffer phosphate solution (PB), the glass slides 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. After mounted with an anti-fade kit^{††††††††}, the samples were examined under epifluorescence^{††††††††}, using a Leica DMLB light microscope^{§§§§§§§§}, with N Plan (310/0.25, 320/0.40) and HCX PL Fluotar (340/0.75, 3100/1.3) objectives, outfitted with a Leica DC 300F digital camera. Acquired digital images were processed with Adobe Photoshop software^{*****}.

Cell Viability

Cell viability was evaluated by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)^{††††††††} assay²⁴. At 7 and 14 days, ADM seeded with CGF and HGF were incubated with 10% of MTT (5 mg/ml) in culture medium at 37°C for 4 h. The medium was then aspirated from the well, and 1 mL of acid isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol) was

---

†††††††† Tissue-Tek OCT; Miles Inc., Elkhat, IN
 †††††††† Sigma
 §§§§§§§§ Molecular Probes, Eugene, OR
 ***** Molecular Probes, Eugene, OR
 †††††††† Vectashield, Vector Labs, Burlingame, CA
 †††††††† Leica, Benstein, Germany
 §§§§§§§§ Leica, Bensheim, Germany
 ***** Adobe Systems
 †††††††† Sigma

added to each well. The plates were then stirred on a plate shaker for 20 min, 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 570–650 nm on the plate reader^{§§§§§§§§§§}, and data were expressed as absorbance.

Cell viability in culture medium conditioned in the ADM

To assess if ADM end products could affect CGF behavior, 1.5 mL of culture medium was conditioned in ADM (CM) for 24 h in humidified atmosphere at 37°C with 5% CO₂. As a control, a 24-well plate containing only culture medium (not conditioned medium - NCM) was maintained under the same conditions. CGF between passages 1–2 were seeded on 24-well plates in polystyrene, at a density of 4×10^4 cells / well, in the same day that started de medium conditioning process. After the conditioning period, 500 µl of CM e NCM was placed in each well containing CGF. After 24, 48 and 72 h the viability of the cultures was assessed by MTT assay, as described previously.

Statistical Analysis

Data presented in this work are the mean of the results of three separate sets of cultures for CGF and HGF, established from three different dogs and patients. For B16F10 it was used three sets of cultures of the same cell lineage. Direct fluorescence experiments were carried out in triplicate (n=3). Comparisons were performed using the nonparametric Mann-Whitney U Test, for independent samples, when comparing two groups, and Kruskal-Wallis, when comparing three or more independent groups, followed by Dunn test for multiple comparisons between two groups (significance level: 5%).

+++++ Fisher Scientific
§§§§§§§§§§ IQuant, Biotek, Winooski, VT

RESULTS

Cell morphology and distribution on ADM

Morphological analyses by direct fluorescence showed that at 12 h, fibroblasts, both CGF and HGF, were adherent and polygonal in shape, with round nuclei, while at 7 and 14 days, these cells were spread, exhibiting an elongated shape, with oval nuclei, and the actin cytoskeleton assembled into stress fibers. Epifluorescence revealed that, at 12 h, cells were adherent on the ADM surface in low density, for all cell types evaluated (Fig. 1A-C). CGF, at 7 (Fig. 1D) and 14 days (Fig. 1G), were unevenly distributed on the ADM surface, forming a discontinuous cell layer and leaving segments devoid of cells. In HGF cultures at 7 days (Fig. 1E) fibroblasts formed of a single cell layer on the ADM surface, which became confluent at 14 days (Fig. 1H). B16F10 were mainly arranged in cell aggregates on the ADM at 7 days (Fig. 1F). At 14 days, a confluent monolayer was noted, although cell aggregates were still observed (Fig. 1I). Rare cells were observed inside the ADM, mostly in the slices of the border and in areas of low collagen fiber bundle density, near the surface (Fig. 1H).

Table 1 shows the mean number of adherent cells on ADM slices, assayed by counting the slices labeled by direct fluorescence. In samples seeded with CGF, there was no differences in the number of adherent cells between experimental periods. HGF were present in higher numbers after 14 days, compared to 12 hours and 7 days, with statistically significant differences ($p < 0.05$). In samples seeded with B16F10 an increase in cell number was observed from 12 hours to 7 days ($p < 0.05$), with no statistically significant differences between 7 and 14 days. Comparing the three different cell types in each period, higher cell numbers were observed in samples seeded with B16F10, followed by HGF and CGF at 7 days ($p < 0.05$). At 14 days, HGF and B16F10 were in higher numbers, with statistically significant difference compared to CGF ($p < 0.05$). No statistically significant differences between HGF and B16F10 was observed at 14 days.

Table 2 shows the mean percentage of cells on the ADM surface (S) and inside (I) ADM by slice at 12 hours, 7 and 14 days. A higher percentage of cells on S compared to I ($p<0.05$) was noticed for all cellular types and evaluated periods. This rate remained stable during all experimental periods for all cell types.

Cell viability

MTT assay indicated a significant higher viability rate in samples seeded with HGF compared to CGF, at 7 and 14 days ($p=0.024$) (Fig 2).

Cell viability in culture medium conditioned in the ADM

Evaluating the effect of ADM end products on CGF viability, MTT assay indicated lower cell viability in samples grown in CM, compared to those grown in NCM, with statistically significant differences at 48 and 72 hours ($p<0.05$) (Fig 3).

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.

In the present study we evaluated if ADM is suitable as a 3D scaffold by seeding human and canine gingival fibroblasts on it. B16F10 murine melanoma cell line, for its highly proliferative and metastatic feature²⁵, were used to evaluate the possibility of ingrowth of cells in the matrix. We also sought to compare the viability of CGF to HGF and also assess whether the conditioned medium in the ADM could interfere with CGF behavior. Up to 14 days of culture CGF were adherent and spread in low density, unevenly distributed on ADM surface, while HGF and B16F10 formed a continuous cell layer lining the ADM surface. The

presence of cells inside the MDA was only occasionally observed. CGF viability was significantly lower compared to HGF. It was further verified that the medium conditioned in the ADM gradually decreases CGF viability, showing that some component released by the ADM changes cell performance significantly.

ADM was chosen as a scaffold for gingival fibroblasts due to its three-dimensional feature, suitable to be implanted in a host. ADM has already showed a good incorporation into host tissues²⁶ *in vivo* and provides favorable clinical outcomes in procedures for gingival tissue augmentation^{16,17,27-35}. Many studies were conducted to evaluate ADM effectiveness as a subepithelial graft compared to autogenous subepithelial connective tissue graft, with similar results between the two techniques with regard to root coverage^{16,20,21,30} and gingival thickness³⁶. However, in most studies, autogenous grafts results in a significantly higher increase in keratinized tissue and clinical attachment level gain^{16,20} as well as shorter healing time^{20,32,36}. Thus, with the incorporation of autogenous cells, it would be possible to optimize and reduce the ADM incorporation time, enabling better clinical outcomes.

Some studies have evaluated the effect of fibroblasts seeding on ADM, with promising results. A preliminary study²³ found that the addition of gingival fibroblasts to the matrix enhanced vascularization *in vivo* in early stages of healing. In that experiment, however, the ADM was placed in contact with cells near the explant - thus, in early stages of function. In addition, no *in vitro* analysis to confirm the effectiveness of cell seeding was performed. In this study, a lot of cells were necessary in each repetition. Thus, even in initial passages, cells had to be replicated to allow the experiments. Izumi et al.⁵, in a clinical study in humans, compared ADM grafting to ADM + keratinocytes after oral premalignant or cancerous lesion treatment, and observed early revascularization, greater reduction in inflammatory response and more rapid and mature epithelial coverage in areas where ADM + keratinocytes were used. Nevertheless, in a prior study *in vitro*¹⁴, the same group did not observed any evidence

of cellular infiltration. Recently, Jhaveri et al.³⁷ evaluated the use of ADM seeded with autogenous gingival fibroblasts for the treatment of gingival recession, comparing with subepithelial connective tissue autograft. There were no significant differences between test and control sites for root coverage and keratinized tissue increase. However, although the authors confirmed the presence of adherent cells on the ADM surface, the internal distribution of these cells was not evaluated.

Morphological analysis by epifluorescence showed CGF adherent and spread, unevenly distributed on the ADM surface, while in samples seeded with HGF and B16F10 a cell layer lining the ADM surface was observed. Fibroblasts, both canine and human, exhibited actin cytoskeleton assembled into stress fibers. The absence of a cell monolayer in samples seeded with CGF probably due to the low density of these cells on the matrix. However, cell counting by epifluorescence indicated that, even in samples seeded with HGF and B16F10, which exhibited a higher cellular density, an expressive ingrowth of cells was not noticed. The proportion of cells on the surface and inside the matrix was similar for all cellular types, in the evaluated periods. Similar results were reported by Erdag & Sheridan⁸, using a dermal equivalent reminiscent of ADM. Fibroblasts suffer cell contact inhibition, which could impair the ingrowth of cells or even trigger the apoptosis pathway^{38,39}. This could explain the absence of these cells inside the matrix.

Studies have shown that while in a 2D culture fibroblasts grow to confluence with no morphology variations, a condition not normally observed in vivo, in 3D culture systems these cells exhibit morphological appearances and a spatial distribution resembling with cells in vivo, maintaining their stellate shape and interacting with each other via cytoplasmic extensions, resulting in the formation of spaces in which the extracellular matrix is formed^{7,40}. Differences in biosynthetic activity and proliferation are still observed, attributed to cell-matrix interactions delivering specific mechanical and chemical signals^{7,41}. Also, in a 3D

collagen matrix with ideal features for cell cultures, fibroblasts can remodel the matrix through its migratory activity^{22,41}. However, fibroblast interactions with collagen matrices are determined at least in part by the cell-matrix tension state, controlled by diverse parameters including collagen density and matrix restraint. At high cell-matrix tension, as could be seen in ADM, fibroblasts exhibit stress fibers and focal adhesions, resembling cells interacting with collagen-coated culture surfaces (2D)⁴².

Current literature provides some studies in which ingrowth of fibroblastic cells into 3D matrices was observed. Hillmann et al.⁷, evaluating the growth of gingival fibroblasts in a 3D 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.⁴³, observed that fibroblasts had migrated through half of the total depth of a dermal equivalent at 14 days. Moscato et al.⁴⁴ showed fibroblasts spread on the surface and across a sponge matrix prepared by mixture of poly (vinyl alcohol) and gelatin.

Hillmann et al.⁹, evaluating biodegradable synthetic collagen matrices as a cell carrier, observed that cell migration was lower on matrices with dense collagen fibrillar network, whereas cells were distributed homogeneously throughout the scaffold with a loose fibrillar structure. In the present study, although cells adhered and spread on the ADM surface, the low number of cells inside the matrix, especially at the central slice, suggests that ADM collagen bundles are arranged too densely to allow a homogeneous cell distribution and the establishment of a tissue-like network. The low porosity and pore interconnectivity in ADM may difficulty the diffusion of nutrients, which prevent the growth of cells in vitro, both on the surface and inside the matrix. Possibly, for tissue engineering, the choice of tissues with the arrangement of collagen matrices less dense could allow homogeneous cell migration throughout the ADM, providing a more favorable scaffold for the transport of cells.

Besides the lower cellular density observed in the morphological analysis by epifluorescence, MTT assay indicated lower cellular viability in samples seeded with CGF, compared to samples seeded with HGF. A lower viability rate in CGF grown in culture medium conditioned in the ADM was also observed. However we could not determine what or which factors were interfering with cell-matrix interaction. One hypothesis could be the presence of unspecified quantities of antibiotics (gentamicin, ceftiofur, lincomycin, polymyxin B and vancomycin) in the matrix. In certain concentrations some antibiotics can decrease cell growth^{45,46}. Due to the constant bacterial contamination in cell cultures, antibiotics are added to the culture medium routinely, especially when cultures are established from infected tissues. Antibiotics in the medium added to those in the matrix can generate toxic effects in CGF cultures.

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 due partly to differences resulting from specific features of each individual or each dog, since data represent the mean of results obtained in the cells seeded from 3 different individuals and 3 different dogs. However, even the samples seeded with the cell line (B16F10) showed variations among the three experiments, showing that even differences in obtaining the matrix can interfere with the results.

CONCLUSION

We can conclude that gingival fibroblasts and even highly proliferative cells as B16F10 can be only superficially located on the ADM and CGF are negatively affected by ADM end products.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil, for his assistance with epifluorescence, and Prof. Dr. Ricardo Della Coletta and Prof. Dr. Edgard Graner, School of Dentistry of Piracicaba, University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil, who provided B16F10 murine melanoma cell line.

CONFLICTS OF INTEREST

This work was supported by the State of São Paulo Research Foundation, São Paulo, SP, Brazil (grant 2006/03063-0 to Dr. Palioto). There was none conflict of interest on the conduction of this work. Dr Maia was supported by a scholarship from the Coordination for the Improvement of Graduated Personnel.

REFERENCES

1. Sipe JD, Kelley CA, McNichol LA. Reparative medicine: growing tissues and organs. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;961:1-389.
2. Taba M, Jr., Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV. Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod Craniofac Res.* 2005;8:292-302.
3. Vacanti JP, Langer R, Upton J, Marler JJ. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998;33:165-182.
4. Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 1998;16:224-30.
5. 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;32:188-97.
6. Yamada K, Yamaura J, Katoh M, Hata K, Okuda K, Yoshie H. Fabrication of cultured oral gingiva by tissue engineering techniques without materials of animal origin. *J Periodontol.* 2006;77:672-7.
7. 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 (Pt 17):2823-32.
8. Erdag G, Sheridan RL. Fibroblasts improve performance of cultured composite skin substitutes on athymic mice. *Burns.* 2004;30:322-8.
9. 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.
10. Ng KW, Khor HL, Huttmacher DW. In vitro characterization of natural and synthetic dermal matrices cultured with human dermal fibroblasts. *Biomaterials.* 2004;25:2807-18.
11. Luitaud C, Laflamme C, Semlali A, et al. Development of an engineering autologous palatal mucosa-like tissue for potential clinical applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;83:554-61.

12. 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;79:1847-56.
13. Zhang X, Deng Z, Wang H, et al. Expansion and delivery of human fibroblasts on micronized acellular dermal matrix for skin regeneration. *Biomaterials*. 2009;30:2666-74.
14. Izumi K, Terashi H, Marcelo CL, Feinberg SE. Development and characterization of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent produced in a serum-free culture system. *J Dent Res*. 2000;79:798-805.
15. Wainwright DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns*. 1995;21:243-8.
16. Novaes AB, Jr., Grisi DC, Molina GO, Souza SL, Taba M, Jr., Grisi MF. 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;72:1477-84.
17. Scarano A, Barros RR, Iezzi G, Piattelli A, Novaes AB, Jr. Acellular dermal matrix graft for gingival augmentation: a preliminary clinical, histologic, and ultrastructural evaluation. *J Periodontol*. 2009;80:253-9.
18. Janson WA, Ruben MP, Kramer GM, Bloom AA, Turner H. Development of the blood supply to split-thickness free gingival autografts. *J Periodontol*. 1969;40:707-16.
19. 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 of treatment. *J Periodontol*. 2001;72:265-73.
20. Wei PC, Laurell L, Geivelis M, Lingen MW, Maddalozzo D. Acellular dermal matrix allografts to achieve increased attached gingiva. Part 1. A clinical study. *J Periodontol*. 2000;71:1297-305.
21. Paolantonio M, di Murro C, Cattabriga A, Cattabriga M. Subpedicle connective tissue graft versus free gingival graft in the coverage of exposed root surfaces. A 5-year clinical study. *J Clin Periodontol*. 1997;24:51-6.
22. Bell E, Ivarsson 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 U S A*. 1979;76:1274-8.
23. 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;78:296-303.
24. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
25. Vayssade M, Sengkhamparn N, Verhoef R, et al. Antiproliferative and proapoptotic actions of okra pectin on B16F10 melanoma cells. *Phytother Res*. 2009;
26. Luczyszyn SM, Grisi MF, Novaes AB, Jr., Palioto DB, Souza SL, Taba M, Jr. Histologic analysis of the acellular dermal matrix graft incorporation process: a pilot study in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2007;27:341-7.
27. Nunez J, Caffesse R, Vignoletti F, Guerra F, San Roman F, Sanz M. Clinical and histological evaluation of an acellular dermal matrix allograft in combination with the coronally advanced flap in the treatment of Miller class I recession defects: an experimental study in the mini-pig. *J Clin Periodontol*. 2009;36:523-31.
28. Barros RR, Novaes AB, Jr., Grisi MF, Souza SL, Taba M, Jr., Palioto DB. New surgical approach for root coverage of localized gingival recession with acellular dermal matrix: a 12-month comparative clinical study. *J Esthet Restor Dent*. 2005;17:156-64; discussion 164.
29. 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;75:1350-6.
30. Harris RJ. Root coverage with a connective tissue with partial thickness double pedicle graft and an acellular dermal matrix graft: a clinical and histological evaluation of a case report. *J Periodontol*. 1998;69:1305-11.

31. Harris RJ. A comparative study of root coverage obtained with an acellular dermal matrix versus a connective tissue graft: results of 107 recession defects in 50 consecutively treated patients. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2000;20:51-9.
32. Tal H. Subgingival acellular dermal matrix allograft for the treatment of gingival recession: a case report. *J Periodontol*. 1999;70:1118-24.
33. Yan JJ, Tsai AY, Wong MY, Hou LT. Comparison of acellular dermal graft and palatal autograft in the reconstruction of keratinized gingiva around dental implants: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2006;26:287-92.
34. Felipe ME, Andrade PF, Grisi MF, et al. Comparison of two surgical procedures for use of the acellular dermal matrix graft in the treatment of gingival recessions: a randomized controlled clinical study. *J Periodontol*. 2007;78:1209-17.
35. de Souza SL, Novaes AB, Jr., Grisi DC, Taba M, Jr., Grisi MF, de Andrade PF. Comparative clinical study of a subepithelial connective tissue graft and acellular dermal matrix graft for the treatment of gingival recessions: six- to 12-month changes. *J Int Acad Periodontol*. 2008;10:87-94.
36. Paolantonio M, Dolci M, Esposito P, et al. Subpedicle acellular dermal matrix graft and autogenous connective tissue graft in the treatment of gingival recessions: a comparative 1-year clinical study. *J Periodontol*. 2002;73:1299-307.
37. 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*:1-12. Posted online on 3 December 2009.
38. Holley RW. Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature*. 1975;258:487-90.
39. Ruoslahti E, Obrink B. Common principles in cell adhesion. *Exp Cell Res*. 1996;227:1-11.
40. Croce MA, Silvestri C, Guerra D, et al. Adhesion and proliferation of human dermal fibroblasts on collagen matrix. *J Biomater Appl*. 2004;18:209-22.
41. Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol*. 2003;13:264-9.
42. Rhee S, Grinnell F. Fibroblast mechanics in 3D collagen matrices. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59:1299-305.
43. Ojeh NO, Frame JD, Navsaria HA. In vitro characterization of an artificial dermal scaffold. *Tissue Eng*. 2001;7:457-72.
44. Moscato S, Mattii L, D'Alessandro D, et al. Interaction of human gingival fibroblasts with PVA/gelatine sponges. *Micron*. 2008;39:569-79.
45. Byarugaba W, Rudiger HW, Koske-Westphal T, Wohler W, Passarge E. Toxicity of antibiotics on cultured human skin fibroblasts. *Humangenetik*. 1975;28:263-7.
46. Goetz IE, Moklebust R, Warren CJ. Effects of some antibiotics on the growth of human diploid skin fibroblasts in cell culture. *In Vitro*. 1979;15:114-9.

TABLES

Table 1 – Mean total number of cells (FGC, FGH e B16F10) present in ADM by slice, at 12 hours, 7 and 14 days.

	CGF	HGF	B16F10
12 h	11.2 ± 5.5 ^{ab}	16.5 ± 10.7 ^{ab}	6.6 ± 4 ^a
7 d	11.1 ± 15.7 ^a	37.4 ± 30.5 ^b	213.7 ± 165.2 ^c
14 d	20.8 ± 30.6 ^{ab}	165.9 ± 95.6 ^c	237.2 ± 101.2 ^c

CGF: canine gingival fibroblasts; HGF: human gingival fibroblasts; B16F10: murine melanoma.

Kruskal-Wallis followed by Dunn's method.

Data are reported as mean ± standard deviation; different letters indicate statistically significant difference intra and intergroups (p<0.05).

Table 2 – Percentage (%) of cells (FGC, FGH E B16F10) present in ADM surface (S) or inside (I) by slice at 12 hours,, 7 and 14 days.

	CGF			HGF			B16F10		
	12 h	7 d	14 d	12 h	7 d	14 d	12 h	7 d	14 d
S	100±0 _a	92.3±10.2 _a	97.5±2.8 _a	100±0 _a	96.5±5.6 _a	86.6±13.2 _a	96.3±10.2 _a	97.3±7.9 _a	95.6±7.7 _a
I	0±0 ^b	7.7±10.2 ^b	2.4±2.8 ^b	0±0 ^b	3.5±5.6 ^b	13.4±13.2 _b	3.7±10.2 ^b	2.6±7.9 ^b	4.3±7.7 ^b

CGF: canine gingival fibroblasts; HGF: human gingival fibroblasts; B16F10: murine melanoma.

Kruskal-Wallis followed by Dunn's method.

Data are reported as mean ± standard deviation; different letters indicate statistically significant difference intra and intergroups (p<0.05).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Epifluorescence of CGF (A, D e G), HGF (B, E e H) and B16F10 (C, F e I) seeded on ADM at 12 h (A, B e C), 7 (D, E e F) and 14 days (G, H e I). Green fluorescence shows actin cytoskeleton, and blue, cell nuclei. Note: on A, B and C, low cellular density on ADM surface at 12 h; on D and G, CGF adherent and spread (arrowhead), but far apart (as is shown in detail on G); on E and H, HGF forming a cell monolayer on ADM surface (arrowhead and detail on H), with the visualization of cells inside the ADM on H (arrowhead); on F and I, B16F10 cells arranged in cellular aggregates (arrowhead); on I, the presence of a cell monolayer can also be observed (arrowhead). Bar = 100 μm (A, B, C, D, E, G and H), 200 μm (F and I) and 50 μm (Detail).

Figure 2. Cell viability rate of CGF and HGF expressed as absorbance at 7 and 14 days. Data are reported as mean $\pm$ standard deviation. Bar indicate statistically significant difference ($p < 0.05$) between CGF and HGF at the same time point.

Figure 3. Cell viability rate of CGF grown in CM and NCM, expressed as absorbance at 24, 48 and 72 hours. Data are reported as mean $\pm$ standard deviation. Bar indicate statistically significant difference ($p < 0.05$) between cultures grown in CM and NCM at the same time point.

ANEXO

ANEXO

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

54

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

Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa - Glaucia Della Rosa - e-mail: glaucer@forp.usp.br

Anexo B – Carta de aprovação do comitê de ética no uso de animais

99
22

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

OF.CEP/91/FORP

Ribeirão Preto, 03 de março de 2009.

Senhora Professora,

Ref.: Processo nº 2007.1.1234.58.5

A pedido da Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva, Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa, desta Faculdade, informamos que o referido Comitê em sua 95ª Sessão, realizada em 26 de fevereiro de 2009, **aprovou o Relatório Final** do Projeto de Pesquisa intitulado **"Avaliação do cultivo de fibroblastos gengivais humanos em matriz dérmica acelular (Alloderm)"**.

Atenciosamente;

Luci Rose Nassif Meneses
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa "ad hoc"

RECEBI O ORIGINAL
06/03/09 às ____ hs

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto Bulle
Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da FORP/USP

AVENIDA DO CAFÉ S/Nº - TEL. (0XX16) 3602 3952/3972 - 3633 3136 FAX (0XX16) 3633-0999
14040-904 - RIBEIRÃO PRETO - SP - BRASIL