

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO CULTIVO DE
FIBROBLASTOS GENGIVAIOS HUMANOS EM
MATRIZ DÉRMICA ACELULAR

Annelissa Zorzeto Rodrigues

Ribeirão Preto

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO CULTIVO DE
FIBROBLASTOS GENGIVAISS HUMANOS EM
MATRIZ DÉRMICA ACELULAR

Annelissa Zorzeto Rodrigues

Orientador: Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto

RIBEIRÃO PRETO

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO CULTIVO DE
FIBROBLASTOS GENGIVAISS HUMANOS EM
MATRIZ DÉRMICA ACELULAR

Annelissa Zorzeto Rodrigues

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Periodontia.

Orientador: Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto

Ribeirão Preto

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Rodrigues, Annelissa Zorzeto

Avaliação *in vitro* do cultivo de fibroblastos gengivais humanos em matriz dérmica acelular, 2008.

81p.: il; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/ USP – Área de Concentração: Periodontia.

Orientador: Palioto, Daniela Bazan

1. Matriz dérmica acelular. 2. Fibroblastos gengivais humanos

Trabalho realizado no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Aos meus pais Gilberto Rodrigues e Vera Lúcia Zorzeto Rodrigues, pelo
amor, incentivo e confiança.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser o meu escudo, a minha fortaleza, o meu lugar seguro.

À minha irmã Annyara e ao meu noivo Fábio pelo apoio incondicional, pela paciência e confiança.

Aos Pastores e irmãos na fé por serem a minha retaguarda de oração.

Aos professores do programa de pós-graduação do departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, Prof. Arthur Belém Novaes Jr., Prof. Márcio Fernando de Moraes Grisi, Prof. Mário Taba Jr. e Prof. Sérgio Luís Scombatti de Souza, obrigada por participarem em mais essa etapa da minha formação profissional.

Especial agradecimento ao Prof. Paulo Tambasco de Oliveira, por sua preocupação, dedicação, profissionalismo e paciência com a realização deste trabalho.

Às minhas amigas da pós-graduação: Adriana Corrêa de Queiroz (Dríca), Germana Jayme Borges (Gê), Flávia Adelino Suaid (Flavinha), Priscila Brasil da Nóbrega (Pri Nóbrega), por toda cumplicidade e amizade.

Aos amigos Roger Rodrigo Fernandes, Lucas Novaes Teixeira, Larissa Moreira Spinola de Castro pela amizade, companheirismo e toda a contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Márcio Mateus Beloti, Profa. Karina B. Fitipaldi, Fabíola Singaretti de Oliveira, Grasiele Edilaine Crippa, Larissa Sverzut Bellesini, Guilherme Macedo, Mônica Macedo, Viviane Kawata, Patrícia de Freitas, Rafael Oliveira, Maria Emília C. Felipe, Thaisângela Rodrigues, Júnia Ramos, Aparecida Dulce de Oliveira Negretti, Tatiana Angeli Passos Fernandes, Sueli, Zilda, Sebastião Carlos Bianco, Regiane Moi, Isabel Solla, Lenaldo Rocha, Vani e Fabiana, por toda a ajuda.

Aos membros docentes e não docentes do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia e do Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

À CAPES, pela bolsa auxílio concedida.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto

A todos que estiveram presentes, muito obrigada.

“Em Deus faremos proezas.”

Salmo 60:12.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

JUSTIFICATIVA

REFERÊNCIAS

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
• Cultura celular.....	26
• Cultura de Tecido.....	27
• Distribuição dos fibroblastos na MDA.....	28
• Proliferação Celular.....	29
• Viabilidade Celular.....	29
• Análise estatística.....	30
3 RESULTADOS.....	31
• Distribuição dos fibroblastos na MDA.....	32
• Proliferação Celular.....	34
• Viabilidade Celular.....	35
4 DISCUSSÃO.....	37
5 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ARTIGO CIENTÍFICO.....	51

Resumo

A matriz dérmica acelular, MDA, figura dentre os biomateriais que têm por objetivo restaurar defeitos mucogengivais. A correção de defeitos mucogengivais a partir de constituintes autógenos são os procedimentos mais comumente usados, no entanto, em decorrência da quantidade insuficiente de tecido doador, esses procedimentos se tornam limitados. Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar, *in vitro*, diferentes aspectos relacionados ao cultivo prévio de fibroblastos gengivais humanos em MDA. Fibroblastos gengivais humanos foram cultivados pela técnica do explante a partir de amostras de tecido gengival queratinizado removido de três pacientes saudáveis. A MDA foi cultivada com esses fibroblastos por períodos de 14 e 21 dias para posterior análise dos eventos de: adesão celular, proliferação e viabilidade. Os resultados mostraram que em 7 dias, os fibroblastos estavam aderidos, espalhados e dispersos sobre a superfície externa da MDA, em 14 dias formavam monocamada de células de morfologia alongada e quiescentes (Ki-67 negativos) em sua maioria, sendo apenas ocasionalmente observadas no interior da MDA. Em 21 dias a monocamada exibia menor densidade celular. Os resultados sugerem que o cultivo de fibroblastos em MDA em períodos de 14 dias permite boas condições de adesão e espalhamento das células sobre a matriz, porém, a alta densidade de fibras colágenas parece ser um fator limitante à migração celular.

Palavras chave: Matriz dérmica acelular, Fibroblastos gengivais humanos

ABSTRACT

Acellular Dermal Matrix, ADM, is a biomaterial that has been used in periodontal procedures to treat mucogingival defects. Mucogingival defects can be corrected by autogenous grafts that are the most common procedure used in periodontology, however, because of the limited source of donor's tissue this procedure became limited. The aim of this investigation was to verify, *in vitro*, different aspects related to human gingival fibroblasts seeding on to the ADM. Human gingival fibroblasts were established from explant cultures from the connective tissue of keratinized gingiva collected from three healthy patients. ADM was seeded with gingival fibroblasts for 14 and 21 days, and then cell adherence, proliferation and viability were analyzed. Results revealed that, at day 7, fibroblasts were adherent and spreading on the ADM surface, and were unevenly distributed, forming a discontinuous single cell layer, at day 14, a confluent fibroblastic monolayer lining ADM surface was noticed. At day 21, the cell monolayer exhibited a reduction in cell density. The results suggests that fibroblasts seeding on the ADM for 14 days can allow good conditions for cell adhesion and spread on the matrix, however, because of the high collagen fiber bundle density cell, migration inside the matrix was limited.

Key words: Acellular Dermal Matrix, Human Gingival Fibroblasts

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

Na última década, as pesquisas se concentraram no desenvolvimento e caracterização de equivalentes de mucosa oral humana a partir da introdução de novos arcabouços e métodos de cultura celular e cultura de tecidos. A construção de órgãos artificiais com a engenharia tecidual é um dos campos da pesquisa que mais avançaram nos últimos anos.^{1,2} A partir das técnicas de engenharia tecidual, vários pesquisadores têm desenvolvido substitutos eficientes para diferentes órgãos e tecidos como a pele,³⁻⁶ córnea;⁷⁻⁹ osso,¹⁰ vasos sanguíneos,¹¹ gengiva^{10,12} dentre outros.

Em relação à mucosa da boca, vários grupos têm desenvolvido diferentes modelos de tecidos artificiais que possam, eventualmente, ser utilizados na reconstrução da mucosa e dos tecidos maxilofaciais.¹³⁻¹⁵ Na engenharia de tecidos orais a seleção de um arcabouço que suporte as células e permita a migração destas para o seu interior, e seja biocompatível e bioestável é fundamental para o sucesso da terapia¹⁶. A matriz dérmica acelular (MDA-AlloDerm™) foi utilizada para esse propósito por Izumi *et al.*,¹⁷ e dentre as vantagens que fazem esse material tão popular estão a sua alta durabilidade e capacidade de manter suas propriedades estruturais.¹⁸⁻²¹

A fonte celular para o cultivo *in vitro* também influencia o desenvolvimento de substitutos orais a serem transplantados. Uma terapia de base celular para regeneração dos tecidos orais deve utilizar, de preferência, células autógenas a fim de evitar que a resposta imunológica do hospedeiro venha destruir esse enxerto alógeno ou xenógeno.²² A cultura de células, queratinócitos e fibroblastos, tem sido associada à MDA.^{19,23} Os fibroblastos são células importantes na cicatrização e reparo dos tecidos por acelerar o

processo de cicatrização, regular a deposição da matriz extracelular, além de sintetizarem uma grande variedade de fatores de crescimento como, por exemplo, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF),^{24,25} fator de crescimento transformador, (TGF-β1)^{24,26} e fator de crescimento de queratinócitos (KGF).²⁷

A pesquisa por novas alternativas, que possam melhorar a incorporação dos enxertos alógenos e o tempo de cicatrização desses materiais, quando usados na cavidade oral para reconstrução ou aumento de tecido mole, ainda é limitada. Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar, *in vitro*, diferentes aspectos relacionados ao cultivo prévio de fibroblastos gengivais humanos em MDA.

REFERÊNCIAS

1. Atala A. Tissue engineering of artificial organs. *J Endourol* 2000; 14(1): 49-57. Review.
2. Alaminos M, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Andrades M, Fernández-Montoya A, Campos A. Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Méd* 2007; 1(5): 350-359.
3. Livesey SA, Herndon DN, Hollyoak MA, Atkinson YH, Nag A. Transplanted acellular allograft dermal matrix. Potential as a template for the reconstruction of viable dermis. *Transplantation* 1995; 60: 1-9.
4. Wainwright DJ. Use of an acellular dermal matrix (AlloDermTM) in the management of full-thickness burns. *Burns* 1995; 21: 243-248.
5. Meana A, Iglesias J, Del Rio M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, Martin C, San Roman F, Tevar F. Large surface of cultured epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gel. *Burns* 1998; 24(7): 621-630.
6. Llames SG, Del Rio M, Larcher F, Garcia E, Garcia M, Escamez MJ, Jorcano JL, Holguin P, Meana A. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation* 2004; 77(3): 350-355.
7. Nishida K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea* 2003; 22: S28-34.
8. Reichl S, Bednarz J, Muller-Goymann CC. Human corneal equivalent as cell culture model for *in vitro* drug permeation studies. *Br J Ophtalmol* 2004; 88: 560-565.

9. Alaminos M, Sanchez-Quevedo MC, Muñoz-Avila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A. Construction of a complete rabbit cornea using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 3311-3317.
10. Mohammadi Y, Soleimani M, Fallahi-Sichani M, Gazme A, Haddadi-Asl V, Arefian E, Kiani J, Moradi R, Atashi A, Ahmadbeigi N. Nanofibrous poly(epsilon-caprolactone)/poly(vinyl alcohol)/chitosan hybrid scaffold for bone tissue engineering using mesenchymal stem cells. *Int J Artif Organs* 2007; 30: 204-211.
11. Pascual G, Rodriguez M, Corrales C, Turégano F, Garcia-Hondurilla N, Bellón JM, Buján J. New approach to improving endothelial preservation in cryopreserved arterial substitutes. *Cryobiology* 2004; 48(1): 62-71.
12. Mc Guire KM, Nunn ME. Evaluation of the safety and efficacy of periodontal applications of a living tissue-engineered human fibroblast-derived dermal substitute. I. Comparison to the gingival autograft: a randomized controlled pilot study. *J Periodontol* 2005; 76: 867-880.
13. Lauer G, Schimming R. Tissue-engineered mucosa graft for reconstruction of the intra-oral lining after freeing of the tongue: a clinical and immunohistologic study. *J Oral Maxillofac Surg* 2001; 59: 169-175.
14. Schultze-Mosgau S, Lee BK, Ries J, Amann K, Wiltfang J. *In vitro* cultured autologous pre-confluent oral keratinocytes for experimental prefabrication of oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33: 476-485.
15. Sanchez-Quevedo MC, Alminos M, Capitan LM, Moreu G, Garzon I, Crespo PV, Campos A. Histological and histochemical evaluation of

- human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Hist Histopathol* 2007; 22(6): 631-640.
16. Kirkpatrick CJ, Krump-Konvalinkova V, Unger RE, Bittinger F, Otto M, Peters K. Tissue response and biomaterial integration: the efficacy of in vitro methods. *Biomolecular Engineering* 2002; 19: 211-217.
17. Izumi K, Takacs G, Terashi H, Feinberg SE. Ex vivo development of a composite human oral mucosa equivalent. *J Oral Maxillofac Surg* 1999; 57(5): 571-577.
18. Heck EL, Bergstresser PR, Baxter CR. Composite skin graft: frozen dermal allografts support the engraftment and expansion of autologous epidermis. *J Trauma* 1985; 25(2): 106-112.
19. Krejci NC, Cuono CB, Langdon RC, McGuire J. In vitro reconstruction of skin: fibroblasts facilitate keratinocytes growth and differentiation on acellular reticular dermis. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 843-848.
20. McKay I, Woodward B, Wood K, Navsaria HA, Hoekstra H, Green C. Reconstruction of human skin from glycerol-preserved allografts and cultured keratinocytes sheets. *Burns* 1994; 20(Suppl1): 19-22.
21. Ghosh MM, Boyce S, Layton C, Freedlander E, Mac Neil S. A comparison of methodologies for the preparation of human epidermal-dermal composites. *Ann Plast Surg* 1997; 39(4): 390-404.
22. Hillmann G, Steinkamp-Zucht A, Geurtzen W, Gross G, Hoffmann a. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. *Biomaterials* 2002; 23: 1461-1469.

23. Medalie DA, Tompkins RG, Morgan Jr. Evaluation of acellular dermis as a dermal analog in a composite skin graft. *ASAIO J* 1996; 42(5): 455-462.
24. Momose M, Murata M, Kato Y, Okuda K, Yamazaki K, Shinohara C, Yoshie H. Vascular endothelial growth factor and transforming growth factors-alpha and beta1 are released from human cultured gingival epithelial sheets. *J Periodontol* 2002; 73(7): 748-753.
25. Bauer SM, Bauer RJ, Liu Z-J, Chen H, Goldestein L, Velazquez OC. Vascular endothelial growth factor-C promotes vasculogenesis, angiogenesis, and collagen constriction in three-dimensional collagen gels. *J Vasc Surg* 2005; 41: 699-707.
26. Sidhu GS, Thaloor D, Singh AK, Raghunath PN, Maheshwari RK. Enhanced biosynthesis of extracellular matrix proteins and TGF- beta 1 by polyinosinic-polycytidylic acid during cutaneous wound healing in vivo. *J Cell Physiol* 1996; 169(1): 108-114.
27. Le Panse R, Bouchard B, Lebreton C, Coulomb B. Modulation of keratinocyte growth factor (KGF) mRNA expression in human dermal fibroblasts grown in monolayer or within a collagen matrix. *Exp Dermatol* 1996; 5(2): 108-114.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O recobrimento radicular, por motivos estéticos ou funcionais, tem se tornado parte importante da terapia periodontal. Durante muitos anos, diversas técnicas e materiais foram sendo aplicados com o propósito de corrigir defeitos gengivais e muitos deles demonstraram ser eficientes para esse propósito.¹ A correção de defeitos mucogengivais a partir de constituintes autógenos são os procedimentos mais comumente usados, no entanto, em decorrência da quantidade insuficiente de tecido doador, esses procedimentos se tornam limitados. Além disso, esse tipo de intervenção cirúrgica normalmente resulta em maior morbidade do paciente, já que são necessários dois sítios cirúrgicos.^{2,3}

Os enxertos autógenos obtidos de diferentes regiões da boca, como o palato e o rebordo edêntulo, são comumente usados nas cirurgias mucogengivais. Apesar dos excelentes resultados estéticos e da alta previsibilidade da técnica,^{4,5} apresentam alguns problemas, incluindo morbidade da área doadora, quantidade limitada de tecido doador e manutenção das características originais dos tecidos doadores.

A matriz dérmica acelular^{*} (MDA) foi introduzida na periodontia como substituto aos enxertos autógenos. A MDA é uma preparação especial de pele humana proveniente de bancos de tecidos, da qual são removidas as células e os constituintes celulares, sem que sejam alteradas a membrana basal e a organização da matriz extracelular, mantendo as fibras colágenas e elásticas intactas.⁶ O processamento da MDA permite que esse tecido liofilizado mantenha a integridade estrutural de toda a matriz extracelular da derme e que

^{**} AlloDerm™, Lifecell Corp, Branchburg, NJ

as células mortas durante o processamento sejam eliminadas. Todo esse processamento também é importante na eliminação de抗ígenos que poderiam induzir reações imunes ou mesmo transmitir doenças.^{6,7}

Na medicina, a MDA é usada desde o início da década de 90 no tratamento de pacientes com queimaduras graves e em cirurgias plásticas reconstrutoras e estéticas.⁸ Na Odontologia, o uso da MDA é mais recente e pode ser indicado em diversos procedimentos periodontais. Aichelmann-Reidy *et al.*⁹ e Novaes Jr *et al.*¹⁰, em estudos clínicos comparativos, controlados e randomizados, avaliaram o uso da MDA e do enxerto subepitelial de tecido conjuntivo (ESTC) no recobrimento radicular e não observaram diferenças clínicas entre as técnicas após controle de 6 meses. Tal *et al.*¹¹ avaliaram o uso da MDA como substituto ao ESTC e também não encontraram diferenças entre os métodos avaliados em relação ao recobrimento radicular.

Haeri & Parsell¹² compararam o uso da MDA e do ESTC no aumento gengival e não observaram diferenças nos resultados em relação à redução da recessão, ganho clínico de inserção ou profundidade de sondagem. Os estudos de Woodyard *et al.*¹³ compararam, numa avaliação de 6 meses, os efeitos clínicos do uso da MDA e do retalho deslocado coronariamente (RDC) para recobrimento radicular e aumento da espessura da gengiva queratinizada, verificando que os casos tratados com MDA resultavam em maior ganho de espessura de gengiva queratinizada.

A MDA também pode ser usada na eliminação de manchas melânicas gengivais. Novaes Jr. *et al.*¹⁴ relataram que a aplicação de MDA foi superior em reduzir a pigmentação, na preservação dos resultados obtidos e previsibilidade quando comparada à técnica convencional. Na correção de defeitos de tecido

mole em rebordos edêntulos, Batista *et al.*¹⁵ demonstraram ganho de tecido mole horizontal e melhor estética. Mais recentemente, Fowler *et al.*¹⁶ verificaram a funcionalidade da MDA como barreira na regeneração óssea guiada, obtendo regeneração óssea e melhores resultados estéticos. Seguindo esse princípio, Novaes Jr & Souza¹⁷ também observaram regeneração óssea completa em alvéolo fresco sem perda em altura ou largura, o que foi posteriormente comprovado por Luczyszyn *et al.*¹⁸, em estudo que avaliou, clínica e histologicamente, o uso da MDA como membrana na prevenção de deformidades de rebordo resultantes de exodontia.

As vantagens em utilizar a MDA, em substituição a enxertos subepiteliais, incluem quantidade ilimitada do material, menor tempo cirúrgico, menor desconforto para o paciente; já que não necessita de uma área doadora, e menor risco de complicações pós-operatórias.¹⁴ No entanto, a ausência de células e vasos torna sua incorporação lenta quando comparada a enxertos subepiteliais. Diferentemente dos enxertos autógenos, que são incorporados aos tecidos por meio de anastomoses dos vasos do tecido enxertado com os do leito receptor, os enxertos alógenos, por serem acelulares e avasculares, dependem, exclusivamente, da reorganização de células e vasos sanguíneos no sítio receptor,^{6,15} mostrando que as interações célula-célula e a manutenção de vasos sanguíneos têm influência na maturação dos enxertos.^{15,19} Devido a essas diferenças Barros *et al.*²⁰ propuseram modificação na técnica cirúrgica, segundo a qual o leito receptor e o tamanho do retalho deveriam ser estendidos com o intuito de aumentar a fonte de nutrição vascular e, consequentemente, de células, e desta forma compensar clinicamente essa deficiência.

Na tentativa de contornar essas dificuldades, a cultura de células epiteliais (queratinócitos) e fibroblastos em MDA tem sido investigada como alternativa para melhorar o tempo de cicatrização, incorporação e diminuição da contração dos tecidos.²¹ No entanto, a eficiência de incorporação dessas células em substitutos dérmicos ainda não está bem estabelecida.

A MDA funciona como um arcabouço para as células do hospedeiro,²² permitindo a formação de uma estrutura biologicamente compatível para que queratinócitos e fibroblastos possam aderir, migrar, repovoar e incorporar o material no novo tecido formado. Os fibroblastos têm papel principal na regeneração dos tecidos. Essas células chegam ao local da injúria nos estágios iniciais e proliferam rapidamente, levando à cicatrização. Além disso, os fibroblastos são capazes de sintetizar uma série de fatores de crescimento, como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante (TGF), e citocinas envolvidos no processo de cicatrização, além de regular a deposição de matriz colágena e estimular a diferenciação de células epiteliais.¹⁹ Além disso, uma vez presentes no equivalente dérmico, os fibroblastos não apenas estimulam a produção de queratinócitos e sua diferenciação, bem como a regeneração da membrana basal pelos queratinócitos da camada basal, acelerando e aumentando a qualidade dos tecidos regenerados.²³

A pesquisa de novas alternativas que possam melhorar a incorporação dos enxertos alógenos e o tempo de cicatrização desses materiais em reconstruções ou aumentos de tecido mole na boca é ainda limitada. Diante

disso, o objetivo desse estudo foi avaliar, *in vitro*, diferentes aspectos relacionados ao cultivo prévio de fibroblastos gengivais humanos em MDA.

MATERIAL E MÉTODOS

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 3 pacientes saudáveis, não fumantes, sem complicações sistêmicas, sem doença periodontal ou qualquer outra infecção bucal, submetidos à cirurgias periodontais que envolviam a remoção de tecidos gengivais sadios.

O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo nº. 2007.1.1234.58.5).

Cultura Celular

Os fibroblastos gengivais foram cultivados a partir da técnica do explante. O tecido removido foi então colocado em tubos de centrífuga[†] de 50 mL, contendo meio de transporte – Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, da sigla em inglês)[‡], 500 µg/mL de vancomicina, 250 µg/mL de gentamicina e 250 ng/mL de fungizona. Após três lavagens de 15 minutos cada com o meio, o tecido foi colocado em placas de Petri para a obtenção de fragmentos de aproximadamente 1 mm³ com lâmina cirúrgica e, posteriormente, transferidos para um frasco[§] de 25 cm³, contendo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino^{**} (FBS- da sigla em inglês), 50 µL/mL de vancomicina, 0,5 µL/mL de gentamicina e 0,2 µL/mL de fungizona e mantidos em atmosfera úmida a 37°C e com 5% de CO₂.

[†] Corning, NY

[‡] Gibco, Gaithersburg, MD

[§] Nunc, Roskilde, Denmark

^{**} FBS, Hyclone, UT

O meio foi trocado 3 vezes por semana. Após confluência, os fibroblastos foram destacados das garrafas com solução de tripsina/EDTA^{††} a 0,05%, seguida de inativação com o meio de cultura. As células destacadas e inativadas foram centrifugadas por 3 minutos a 30000 rpm e o *pellet* formado, ressuspendido em novo meio de cultura. As células utilizadas estavam entre a primeira e a quarta passagem.

Cultura de tecido

Primeiramente, seguindo as orientações do fabricante, o material foi recortado e lavados em 50 mL de solução salina estéril por 10 minutos. Após flutuar sobre o papel protetor de suporte, o material foi transferido para outra cuba com 50 mL de solução salina e mais duas lavagens de 10 minutos foram realizadas. Uma amostra de aproximadamente 20 X 40 mm foi recortada em pedaços de 10 x 7 mm cada. As amostras foram posicionadas no fundo dos poços de placas de poliestireno de 24 poços e as células, plaqueadas na densidade de 60000 células/mL. A densidade de células plaqueadas sobre a matriz foi determinada com base em avaliações preliminares, nas quais puderam ser comparadas diferentes densidades de plaqueamento (dados não mostrados). As culturas se desenvolveram por períodos de 14 ou 21 dias.

Distribuição dos fibroblastos na MDA

Para verificar a distribuição dos fibroblastos pela MDA, realizou-se protocolo de fluorescência direta para marcações do citoesqueleto de actina e núcleos celulares. Após 14 e 21 dias, as amostras de MDA + fibroblastos foram

^{††} Gibco, Gaithersburg, MD

removidas dos poços, congeladas com gelo seco e montadas com um composto de temperatura ótima de corte OCT[#] (OCT, da sigla em inglês). Os fragmentos congelados foram recortados em criostato numa espessura de 10 µm e colocados em lâminas gelatinizadas. As amostras foram recortadas em três diferentes profundidades denominadas de borda (B), transição (T) e centro (C), permitindo a localização das células na superfície (S) ou no interior (I) da MDA (Fig. 1). As lâminas com os cortes congelados foram lavadas em solução de fosfato tamponado (PB, da sigla em inglês) e as células, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5% em PB por 10 minutos, seguido de bloqueio em leite desnatado a 5% em PB por 30 minutos. Procedeu-se em seguida à incubação com faloidina conjugada com Alexa Fluor 488^{§§} (fluorescência verde, 1:200), por 60 minutos, em ambiente úmido e à temperatura ambiente, para detecção do citoesqueleto de actina. Após lavagem em PB, foi feita incubação com DAPI^{***} a 300 nM, por 5 minutos, para identificação dos núcleos com fluorescência azul. Após a montagem, com meio de montagem *anti-fade*^{†††}, as marcações foram analisadas por epiluminação em microscópio de fluorescência Leica^{‡‡}.

[#] Tissue-Tek OCT compound; Miles Inc., Elkhart, IN

^{§§} Molecular Probes, Eugene, OR

^{***} Molecular Probes, Eugene, OR

^{†††} Vectashield, Vector Labs, Burlingame, CA

^{‡‡} Leica, Benstein, Alemanha

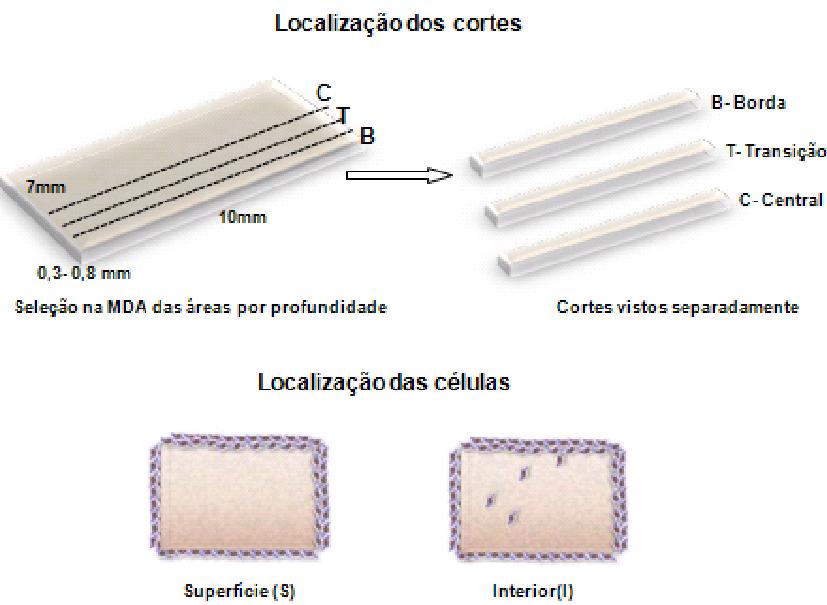


Figura 1. Representação esquemática dos cortes na MDA segundo a profundidade e localização das células.

Proliferação Celular

O método de imunofluorescência indireta foi utilizado para se determinar a proporção de células no ciclo celular, por localização da molécula Ki-67 nos núcleos celulares.²⁴ O procedimento histoquímico para marcação com Ki-67 segue o mesmo protocolo descrito anteriormente,²⁵ utilizando-se o anticorpo primário policlonal anti-Ki-67 humano^{\$\$\$} (1:70), seguido de secundário cabra anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 594 (1:200)^{****}.

Viabilidade celular

A viabilidade das células foi determinada por citometria de fluxo usando como marcadores a anexina V^{††††} e o iodeto de propídeo^{††††} (PI, da sigla em

^{\$\$\$} Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA

^{****} Molecular Probes, Eugene, OR

^{††††} Dako, Golstrup, DK

inglês). Para o isolamento/obtenção das células presentes na superfície e no interior da MDA, as amostras foram submetidas a 9,5 mL de tripsina\$\$\$\$, 500 µL de colagenase***** e 500 µL de EDTA por 15 min em atmosfera úmida a 37⁰C e com 5% de CO₂. Em seguida o processo foi inativado com 2,5 mL do meio contendo soro, e as células, centrifugadas por 10 min a 20000 rpm. O sobrenadante foi removido e o *pellet*, ressuspensos em 445 µL de tampão de ligação diluído. Incubou-se a anexina V por 10 min em gelo no escuro. Adicionaram-se às amostras não marcadas, 50 µL de PI a 100 µg/mL. A marcação com anexina V detecta células em apoptose, enquanto que o PI, células não viáveis.

Análise estatística

Cada experimento foi realizado três vezes, utilizando-se para isso células de três diferentes doadores. Para cada grupo experimental e para cada parâmetro as avaliações foram realizadas em triplicata. Os dados foram comparados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes (nível de significância: 5%).

**** Sigma Chemical CO, St. Louis

\$\$\$\$ Gibco Gaithersburg, MD

***** Gibco, Gaithersburg, MD

RESULTADOS

3 RESULTADOS

Distribuição dos fibroblastos na MDA

Observou-se, por epifluorescência, que em 7 dias os fibroblastos estavam aderidos e espalhados sobre a MDA, mas não formavam camada contínua, deixando segmentos da superfície da matriz destituídos de células (Fig. 2, A e B). Aos 14 dias, notava-se a formação de monocamada confluente sobre a MDA (Fig. 2, C e D), cujos fibroblastos, de distribuição homogênea, exibiam morfologia alongada e citoesqueleto de actina com fibras de estresse (*stress fibers*). Eram apenas ocasionais as células no interior da MDA nesse período, as quais eram observadas nos corte da borda e em áreas de menor densidade de fibras (Fig. 2D). Em 21 dias, os aspectos eram semelhantes aos observados em 14 dias, apesar de se notar menor densidade de células na monocamada (Fig.2, E e F).

A tabela 1 mostra o número de células encontradas nas diferentes profundidades dos cortes (B- borda, T- transição, C- central) e a relação entre o número de células que estavam na superfície (S) e no interior (I) da matriz. Em 14 dias foi possível observar uma maior quantidade de células no interior da MDA nos cortes considerados como borda ($BI=16,5\%$), enquanto que no corte considerado como centro a quantidade de células que penetrou na MDA foi menor ($CI= 2,5\%$).

Com 21 dias de cultivo, observou-se uma redução na quantidade de células na superfície da MDA se comparado ao de 14 dias ($BS_{14d}= 41,1\%$, $BS_{21d}= 29,7\%$). No entanto, esse número foi maior nos cortes centrais ($CI_{14d}= 2,5\%$; $CI_{21d}=4,3\%$).

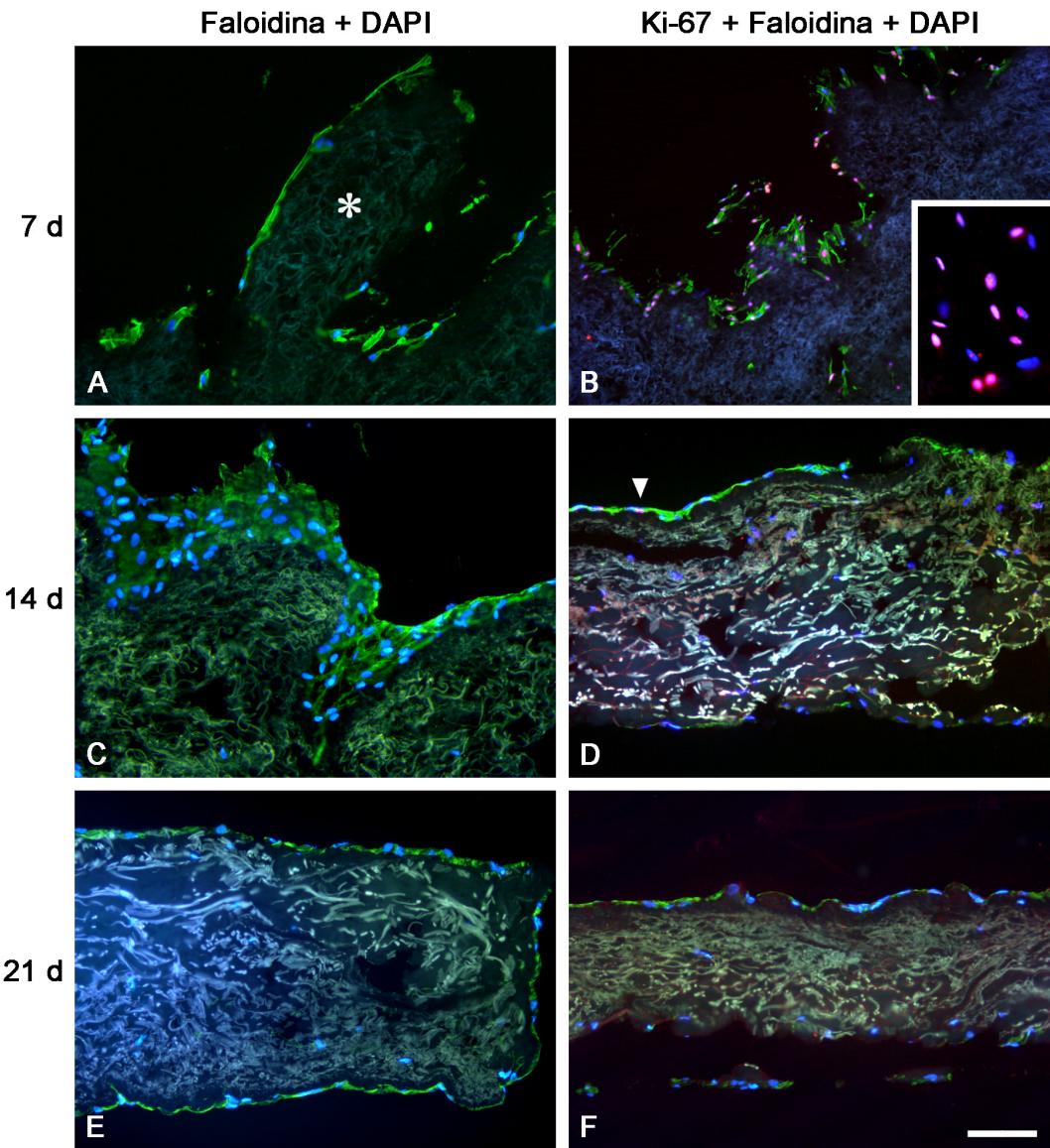


Figura 2. Epifluorescência de culturas de fibroblastos gengivais humanos sobre MDA (indicada por asterisco em A) em 7 (A e B), 14 (C e D) e 21 dias (E e F), marcados com faloidina (fluorescência verde) e DAPI (fluorescência azul), para visualização do citoesqueleto de actina e núcleos, respectivamente. Em B, D e F, imunomarcação ao antígeno nuclear Ki-67, representada em magenta por sobreposição das fluorescências vermelha (Ki-67) e azul (DAPI). Notem-se: em A e B, células aderidas e espraiadas, mas distantes umas das outras; em C e D, a formação de monocamada de células e, em E e F, menor densidade celular. Detalhe em B evidencia predominância de células no ciclo celular (Ki-67 positivas) em 7 dias, as quais são apenas ocasionais em 14 (D, cabeça de seta) e 21 dias. Objetivas de 20X (A, C, D, E, F), 10X (B) e 30X (Detalhe). Barra equivalente a 100 µm (A, C, D, E e F), 50 µm (B) e 75 µm (Detalhe).

Tabela 1. Proporção de fibroblastos aderidos na superfície ou no interior da MDA em 14 e 21 dias.

	14 dias		21 dias		valor de p
	Média	Mediana (amplitude)	Média	Mediana (amplitude)	
BI	16,5	10,2 (8,7-30,6)	13,3	14 (8-18)	0,5
BS	41,1	33(28,4-62)	29,7	24,3 (24-41)	0,2
TI	5,1	5 (4-6,4)	7,6	6 (4-13)	0,42
TS	20,6	19,6 (16,1-26)	29	31 (24-32)	0,1
CI	2,5	3,4 (0,7-3,5)	4,3	4 (4-5)	0,05*
CS	14,1	10,4 (5-27)	15,6	11 (8-28)	0,35

Teste U de Mann-Whitney. Significância estatística * $p \leq 0,05$.

Proliferação Celular

Em 7 dias, observou-se um elevado percentual de fibroblastos que exibiam expressão nuclear do marcador de ciclo celular Ki-67, cerca de 90% das células aderidas à superfície da MDA (Fig. 2B). No entanto, nos tempos de 14 e 21 dias, eram apenas ocasionais os núcleos imunomarcados para Ki-67 (Fig. 2, D e F, respectivamente; em D, indicado por cabeça de seta). Os resultados da tabela 2 mostram que nesses períodos, as proporções de células Ki-67 positivas tanto na superfície como no interior da MDA foram, em geral, reduzidas, sendo relativamente maiores na superfície da MDA. Não foi observada diferença estatisticamente significante para a comparação entre 14 e 21 dias.

Tabela 2. Proporções de fibroblastos no ciclo celular por imunomarcação para Ki-67 na MDA

	14 dias		21 dias		valor de p
	Média	Mediana (amplitude)	Média	Mediana (amplitude)	
BI	0,7	0,6 (0,4-1)	0,7	0,6 (0-1,6)	0,57
BS	2,3	2,5 (1,3-3,5)	1,9	1,1 (0-4,7)	0,35
TI	0,5	0,5 (0,4-0,8)	0,4	0,5 (0,2-0,5)	0,35
TS	0,9	0,6 (0,4-1,8)	1,2	0,7 (0,3-2,7)	0,5
A	0	0 (0-0,2)	0,4	0,5 (0,2-0,6)	0,07
CS	0,3	0 (0-0,9)	0,7	0,7 (0-1,4)	0,35

Teste U de Mann-Whitney. Significância estatística * $p \leq 0,05$.

Viabilidade Celular

Os resultados de viabilidade celular mostram um elevado percentual de células viáveis sobre a MDA em 14 e 21 dias (Fig. 3), com valores médios de 96,4% e 94,9%, respectivamente. Não houve diferença para o índice de apoptose nos tempos de 14 e 21 dias (Fig. 4), sendo os valores médios de 19,5% e 22,7%, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significante para a comparação de viabilidade e de apoptose em 14 e 21 dias.

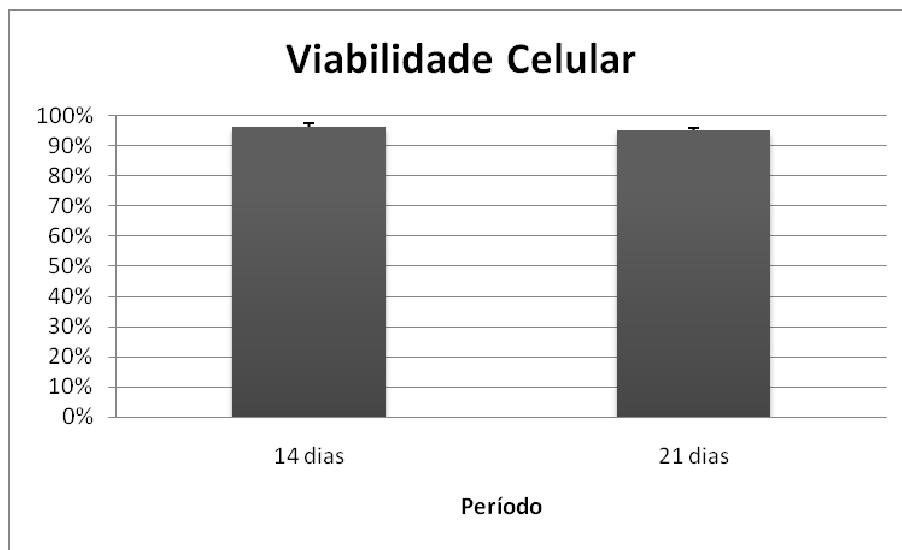


Figura 3. Viabilidade celular de células fibroblásticas derivadas de tecido gengival humano cultivada sobre MDA, avaliada em 14 e 21 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão ($n=3$).

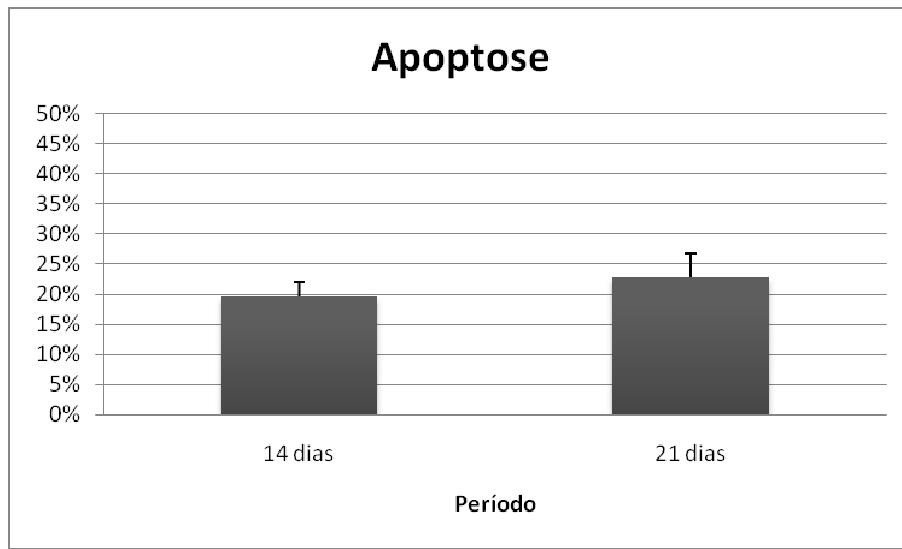


Figura 4. Índice de apoptose em fibroblastos gengivais humanos cultivados sobre a MDA por marcação positiva para anexina V. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão ($n=3$).

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

No presente estudo foi investigada a possibilidade de se adicionarem fibroblastos gengivais humanos à MDA, com o propósito de criar um arcabouço com nova configuração, capaz de minimizar os eventos inflamatórios e cicatriciais, melhorar a reorganização dos tecidos, bem como acelerar o processo de neoangiogênese. Enquanto que em 7 dias, os fibroblastos estavam aderidos, espraiados e dispersos sobre a superfície externa da MDA, em 14 dias formavam de monocamada de células de morfologia alongada e quiescentes (Ki-67 negativos) em sua maioria, sendo apenas ocasionalmente observadas no interior da MDA. Em 21 dias a monocamada exibia menor densidade celular.

Em estudo *in vitro*, Bell *et al.*²⁶ descreveram cultura de fibroblastos dérmicos autógenos em matriz colágena com arranjo tridimensional e demonstraram a formação de uma estrutura semelhante ao tecido dérmico. O comportamento dos fibroblastos cultivados *in vitro* sobre matriz colágena com arranjo tridimensional assemelha-se ao de fibroblastos *in vivo* em relação à morfologia,²⁷ síntese protéica,²⁸ expressão de enzimas^{29,30} e regulação do crescimento celular.³¹

O estudo da morfologia celular por epifluorescência permitiu a observação de células fibroblásticas aderidas e espraiadas sobre a MDA, com citoesqueleto de actina organizado em fibras de estresse (*stress fibers*). A adesão celular ao substrato regula o crescimento, migração, diferenciação e viabilidade celular, além da organização tecidual e remodelamento da matriz.^{32,33} A distribuição das células no arcabouço e sua proliferação são aspectos importantes para a engenharia de tecidos.³⁴ A formação de

monocamada de células ao longo de toda a superfície da MDA em culturas de 14 dias possivelmente está associada ao fato de haver reduzida migração celular para o interior de sua estrutura. A arquitetura densa de matrizes/arcabouços parece ser um fator limitante à penetração das células e, desta forma, a proliferação fica restrita às camadas periféricas, sobre as quais as células aderem, espraiam. Resultados semelhantes foram relatados por Ojhe *et al.*,³⁵ que utilizaram derme humana produzida segundo os mesmos princípios de fabricação da MDA. No entanto, essa característica não se restringe à MDA. Hillmann *et al.*,³⁶ avaliando a funcionalidade de matrizes colágenas reabsorvíveis sintéticas como carreadoras de células, observaram que, em matrizes com fibras colágenas densamente organizadas, a migração celular é reduzida, enquanto que em membranas com arranjo mais frouxo, as células migram por todo o arcabouço.

Maasser *et al.*³⁷ demonstraram que a migração de fibroblastos em matrizes com arranjo tridimensional requer adesão celular e remodelação da matriz. No presente estudo, apesar de as células fibroblásticas estarem aderidas e espraiadas sobre a MDA, sua presença em reduzido número em regiões mais profundas da matriz, principalmente nos cortes mais centrais, sugere a incapacidade dessas células, decorridos 14 e 21 dias, de remodelar fibras colágenas densamente organizadas, as quais funcionariam como uma barreira física. Ainda que um tempo maior de cultivo permitisse que as células conseguissem remodelar a matriz colágena e migrar para o seu interior, é importante considerar que o maior tempo de cultivo implica em maior interação célula-célula durante a confluência, o que pode induzir as células à apoptose, por inibição de contato.^{38,39} Além disso, quando cultivadas por longos períodos,

essas células podem apresentar alterações fenotípicas relevantes,⁴⁰ o que influenciaria a qualidade do enxerto.

O aumento progressivo da densidade celular na superfície da MDA favorece o estabelecimento de interações célula-célula, que em culturas de fibroblastos, é um fator limitante à proliferação.³⁸ Esse fato fica bastante evidente quando a proliferação é avaliada em 7 dias, com fibroblastos aderidos e espalhados sobre a MDA, distribuídos de forma descontínua, exibem, em sua maioria, cerca de 90% de marcação positiva para o anticorpo anti-Ki 67. A baixa proliferação celular observada, nos tempos experimentais de 14 e 21 dias, ratifica resultados de outros autores que também observaram uma menor proliferação dessas células quando cultivadas sobre matrizes colágenas.^{41,42} Croce *et al.*,⁴³ estudando o comportamento de fibroblastos dérmicos humanos cultivados em camadas de fibras colágenas, observaram que o índice de proliferação desses fibroblastos era menor do que aquele observado em células crescidas sobre superfície de poliestireno. Schor⁴⁴ relatou que a provável razão para o crescimento lento dos fibroblastos em matrizes colágenas pode ser resultado de diversos fatores, entre eles a reduzida disponibilização de nutrientes. A baixa porosidade e a baixa interconectividade dos poros na MDA pode dificultar a difusão de nutrientes, inviabilizando a penetração das células para o interior da MDA, e favorecendo crescimento celular apenas na superfície.

A MDA é uma importante fonte de matriz extracelular colágena e não colágena, e nesse sentido pode atuar como um arcabouço que favorece a formação de uma estrutura biologicamente compatível sobre a qual os fibroblastos podem aderir, espalhar, proliferar e migrar. A maior importância do

cultivo prévio de fibroblastos sobre matrizes colágenas está relacionada à possibilidade de essas células sintetizarem, *in vitro*, alguns fatores de crescimento que ficam depositados sobre a matriz, mantendo-se ativos mesmo depois de transplantados *in vivo*.⁴⁵ Dessa forma, contribuiriam para o processo de revascularização e cicatrização da MDA.

O cultivo de fibroblastos gengivais em MDA por 14 dias pareceu ser suficiente para garantir a adesão celular, espriamento, proliferação e migração celular sobre a superfície da MDA, que neste contexto, funcionaria como carreadora de células e proporcionaria acelerada revascularização,¹⁹ aumento tecido gengival queratinizado,⁴⁶⁻⁴⁸ e menor desconforto para o paciente. Para a engenharia tecidual, os dados sugerem que seria necessária uma modificação no arranjo denso das fibras colágenas da matriz de forma que a estrutura fosse alterada sem comprometer a funcionalidade ou durabilidade, permitindo a migração de células por toda a MDA.

CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que no cultivo de fibroblastos sobre a MDA:

- A adesão e morfologia celulares não foram afetadas pela composição e estrutura da MDA. Sendo a MDA capaz de proporcionar um ambiente biologicamente compatível no qual as células podem aderir, espraiar, proliferar e migra.
- A alta densidade de fibras colágenas parece ser um fator limitante à migração celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Cummings LC, Kaldahl WB, Allen EP. Histologic evaluation of autogenous connective tissue and acellular dermal matrix grafts in humans. *J Periodontol* 2005; 76: 178-186.
- 2- Branham GH, Thomas JR. Skin grafts. *Otolaryngol Clin North Am* 1990; 23: 889-897
- 3- Ophof R, van Rheden REM, Von den Hoff JW, Schalkwijk J, Kuijpers-Jagtman AM. Oral Keratinocytes cultured on dermal matrices form a mucosa-like tissue. *Biomaterials* 2002; 23: 3741-3748.
- 4- Bouchard P, Etienne D, Ouhayoun J, Nilveus R. Subepithelial connective tissue graft in the treatment of gingival recession. A comparative study of two procedures. *J Periodontol* 1994; 65: 929-936.
- 5- Borguetti A, Louise F. Controlled clinical evaluation of the subpedicle connective tissue graft for the coverage of gingival recession. *J Periodontol* 1994; 65: 1107-1112.
- 6- Wainwright DJ. Use of an acellular dermal matrix (AlloDermTM) in the management of full-thickness burns. *Burns* 1995; 21: 243-248.
- 7- Livesey SA, Herndon DN, Hollyoak MA, Atkinson YH, Nag A. Transplanted acellular allograft dermal matrix. Potential as a template for the reconstruction of viable dermis. *Transplantation* 1995; 60: 1-9.
- 8- Achauer BM, VanderKam VM, Celikoz B, Jacobson DG. Augmentation of facial soft tissue defects with Alloderm dermal graft. *Ann Plast Surg* 1998; 56: 722-727.

- 9- Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA, Evans GH, Nasr HF, Mayer ET. Clinical evaluation of acellular allograft dermis for the treatment of human gingival recession. *J Periodontol* 2001; 72: 998-1005.
- 10- Novaes Jr AB, Grisi DC, Molina GO, Souza SLS, Taba Jr M, 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(11): 1477-84.
- 11- Tal H, Moses O, Zohar R, Meir H, Nemcovsky C. Root coverage of advanced gingival recession: A comparative study between acellular dermal matrix allograft and subepithelial connective tissue grafts. *J Periodontol* 2002; 73: 1405-1411.
- 12- Haeri A, Parsell D. Creeping attachment: autogenous graft vs. dermal matrix allograft. *Compendium* 2000; 21: 725-730.
- 13- Woodyard JG, Greenwell H, Hill M, Drisko C, Iasella JM, Scheetz J. The clinical effect of acellular dermal matrix on gingival thickness and root coverage compared to coronally positioned flap alone. *J Periodontol* 2004; 75: 44-56.
- 14- Novaes Jr AB, Pontes CC, Souza SLS, Grisi MFM, Taba Jr. M. The use of acellular dermal matrix allograft for the elimination of gingival pigmentation: case representation with 2 years of follow-up. *Prect Proced Aesthet Dent* 2002; 14(8): 619-623.
- 15- Batista Jr EL, Batista FC, Novaes Jr AB. Management of soft tissue ridge deformities with acellular dermal matrix. Clinical approach and outcome after 6 months of treatment. *J Periodontol* 2001; 72: 265-273.

- 16- Fowler BF, Lawrence GB, Rebitski G. Ridge preservation utilizing an acellular dermal allograft and desmineralized freeze-dried bone allograft: Part I. A report of 2 cases. *J Periodontol* 2000; 71: 1353-1359.
- 17- Novaes Jr AB, Souza SLS. Acellular dermal matrix graft as a membrane for guided bone regeneration: A case report. *Implant Dent* 2001; 10(3): 192-196.
- 18- Luczyszyn SM, Papalexiou V, Novaes Jr AB, Grisi MFM, Souza SLS, Taba Jr M. Acellular dermal matrix and hidroxyapatite in prevention of ridge deformities after tooth extraction. *Implant Dent* 2005; 14(2): 176-184.
- 19- Erdag G, Sheridan RL. Fibroblasts improve performance of cultured composite skin substitute on athymic mice. *Burns* 2004; 30: 322-328.
- 20- Barros RRM, Novaes Jr AB, Grisi MFM, Souza SLS, Taba Jr M, Palioto DB. A 6-mounth comparative clinical study of a conventional and new surgical approach for root coverage with acellular dermal matrix. *J Periodontol* 2004; 75: 1350-1356.
- 21- Lamme EN, Van Leeuwen RT, Brandsma K, Marle JV, Middlkoop E. Higher numbers of autologous fibroblasts in an artificial derma substitute improve tissue regeneration and modulate scar tissue formation. *J Pathol* 2000; 190(5): 595-603.
- 22- Herson MR, Mathor MB, Altran S, Capelozzi VL, Ferreira MC. In vitro construction of a potential skin substitute through direct human keratinocyte plating onto decellularized glycerol-preserved allodermis. *Artif Organs* 2001; 25(11): 901-906.
- 23- Okamoto E, Kitano Y. Expression of basement membrane components in skin equivalents- influence of dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci* 1993; 5(2): 81-88.

- 24- Scholzen T, Gerdes J. The ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311-322.
- 25- De Oliveira PT, De Oliva MA, Maximiano WMA, Sebastião KEV, Crippa GE, Ciancaglini P, Beloti MM, Nanci A, Rosa AL. Effects of a mixture of growth factors and proteins on the development of the osteogenic phenotype in human alveolar bone cell cultures. *J Histochem Cytochem* 2008; Epub ahead of print.
- 26- Bell E, Ivarson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 1979; 76(3): 1274-1278.
- 27- Bell E, Sher S, Hull B, Merril C, Rosen S, Chamson A, Asselineau D, Dubertret L, Coulomb B, Lapierre C, Nusgens B, Neveux Y. The reconstruction of a living skin. *J Invest Dermatol* 1983; 81: 2-10.
- 28- Nusgens B, Merrill C, Laprière C, Bell E. Collagen biosynthesis by cells in a tissue equivalent matrix in vitro. *Collagen Related Res* 1984; 4: 351-364.
- 29- Coulomb B, Dubertret L, Bell E, Merril C, Fosse M, Breton-Gorius J, Prost C, Touraine ER. Endogenous peroxidases in normal human dermis: a marker of fibroblasts differentiation. *J Invest Dermatol* 1983; 81: 75-78.
- 30- Colige AC, Lambert CA, Nusgens BV, Laprière CM. Effect of cell-cell ad cell-matrix interactions on the response of fibroblasts to epidermal growth factor in vitro. *Biochem J* 1992; 285: 215-221.
- 31- Sarber R, Hull B, Merrill C, Soranno T, Bell E. Regulation of proliferation on fibroblasts of low and high population doubling levels grown in collagen lattices. *Mech Ageing Dev* 1981; 17: 107-117.
- 32- Bromberg BE, Song IC. Pig slim heterografts. *Minn Med* 1965; 48(12): 1605-1609.

- 33- Wang HJ, Chou TD, Tsou TL, Chen TM, Chen SL, Chen SG, Wei LG, Yeh KJ, Ko YH, Wang CS, Lee WH. The application of new biosynthetic artificial skin for long-term temporary wound coverage. *Burns* 2005; 31: 991-997.
- 34- Ng KW, Khor HL, Hutmacher DW. In vitro characterization of natural and synthetic dermal matrices cultured with human dermal fibroblasts. *Biomaterials* 2004; 25: 2807-2818.
- 35- Ojeh NO, Frame JD, Navsaria HA. In vitro Characterization of an artificial dermal scaffold. *Tissue engineering* 2001; 7(4): 457-472.
- 36- Hillmann G, Steinkamp-Zucht A, Geurtsen W, Gross G, Hoffmann A. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. *Biomaterials* 2002; 23: 1461-1469.
- 37- Masser K, Wolf K, Klein CE, Niggemann B, Zanker KS, Brocker EB, Friedl P. Functional hierarchy of simultaneously expressed adhesion receptors: integrin alpha2beta1 but not CD44 mediates MV3 melanoma cell migration and matrix reorganization within three-dimensional hyaluronan-containing collagen matrices. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 3067-3079.
- 38- Holley RW. Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature* 1975; 11(258): 487-490.
- 39- Ruoslahti E, Obrink B. Common Principles in Cell Adhesion. *Experimental Cell Res* 1996; 227: 1-11.
- 40- Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol* 1994; 124: 401-404.
- 41- Mio T, Adachi Y, Romberger DJ, Ertl RF, Rennard SI. Regulation of fibroblast proliferation in three-dimensional collagen gel matrix. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1996; 32(7): 427-433.

- 42- Hillmann G, Gebert A, Geurtsen W. Matrix expression and proliferation of primary gingival fibroblasts in a three-dimensional cell culture model. *J Cell Sci* 1999; 112: 2823-2832.
- 43- Croce MA, Silvestri C, Guerra D, Carnevali E, Boraldi F, Tiozzo R, Parma B. Adhesion and proliferation of human dermal fibroblasts on collagen matrix. *J Biomater Appl* 2004; 18: 209-222.
- 44- Schor SL. Cell proliferation and migration on collagen substrata in vitro. *J Cell Sci* 1980, 41: 159-175.
- 45- Gentskow G, Jensen J, Pollak R *et al.* Improved healing of diabetic foot ulcers after grafting with a living human dermal replacement. *Wounds* 1999; 11(3); 77-84.
- 46- Pini Prato GP, Rotundo R, Magnani C, Soranzo C, Muzzi L, Cairo F. An autologous cell hyaluronic acid graft technique for gingival augmentation: A case series. *J Periodontol* 2003; 74: 262-267.
- 47- McGuire KM, Nunn ME. Evaluation of a safety and efficacy of periodontal applications of a living tissue engineered human fibroblast-derived dermal substitute. I. Comparison to the gingival autograft: a randomized controlled pilot study. *J Periodontol* 2005; 76: 867-880.
- 48- Mohammadi Y, Soleimani M, Fallahi-Sichani M, Gazme A, Haddadi-Asl V, Arefian E, Kiani J, Moradi R, Atashi A, Ahmadbeigi N. Nanofibrous poly(epsilon-caprolactone)/poly (vinyl alcohol)/ chitosan-hybrid scaffold for bone tissue engineering using mesenchymal stem cells. *Int J Artif Organs* 2007; 30: 204-211.

ARTIGO CIENTÍFICO

ARTIGO CIENTÍFICO

Parte dos resultados obtidos no presente estudo foram utilizados para a elaboração do seguinte artigo científico:

Rodrigues, AZ; De Oliveira PT, Novaes Jr. AB, Souza, SLS, Grisi, MFM, Taba Jr. M, Palioto DB. Evaluation of *in vitro* human gingival fibroblasts seeding on the acellular dermal matrix.

Este artigo será submetido à publicação e é apresentado nas páginas que se seguem.

Evaluation of *in vitro* human gingival fibroblasts seeding on the acellular dermal matrix.

Annelissa Zorzeto Rodrigues* DDS

Paulo Tambasco de Oliveira † DDS, PhD

Arthur Belém Novaes Júnior* 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

†Cell Culture Laboratory, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil

Correspondence: Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior, 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: novaesjr@forp.usp.br

ABSTRACT

Background: Acellular Dermal Matrix, ADM, is a biomaterial that has been used in periodontal procedures to treat mucogingival defects. Mucogingival defects can be corrected by autogenous grafts that is the most common procedure used in periodontology, however, because of the limited source of donor's tissue this procedure became limited. The aim of this investigation was to verify, *in vitro*, different aspects related to human gingival fibroblasts seeding onto the ADM.

Methods: Human gingival fibroblasts were established from explant culture from the connective tissue of keratinized gingiva collected from three healthy patients. ADM was seeded with gingival fibroblasts for 14 and 21 days, and then cell adherence, proliferation and viability were analyzed.

Results: Results revealed that, at day 7, fibroblasts were adherent and spread on the ADM surface, and were unevenly distributed, forming a discontinuous single cell layer, at day 14, a confluent fibroblastic monolayer lining ADM surface was noticed. At day 21, the cell monolayer exhibited a reduction in cell density.

Conclusion: The results suggests that fibroblasts seeding on the ADM for 14 days can allow good conditions for cell adhesion and spreading on the matrix, however, because of the high collagen fiber bundle density cell, migration inside the matrix was limited.

Key words: Acellular Dermal Matrix, Human Gingival Fibroblasts

INTRODUCTION

Root coverage, for esthetic as well as for functional reasons, has become an important part of periodontal therapy. Over the years, various materials and techniques have been applied to correct gingival recession defects and most of them seem to be effective.¹ Autogenous gingival grafts for the treatment of mucogingival defects are the most common procedure in periodontology; however, the insufficient source of donor area makes the process limited. Besides the, surgical procedures result in morbidity and a certain degree of discomfort to the patient due to the two surgical sites involved.^{2,3}

Autogenous grafts can be harvested from different regions of the mouth, such as the palate and the edentulous ridges, and are commonly used on mucogingival surgeries. Regardless the excellent esthetic results and the high technical predictability,^{4,5} they present some limits including donor area morbidity, amount of available of donor tissue and maintenance of the clinical characteristics of the donor area.

The acellular dermal matrix^{†††††} (ADM) was introduced in periodontology as a substitute for the autogenous grafts. ADM is produced from human dermis, from tissue banks, by a carefully controlled process that removes the epidermis and the cells from the dermis without altering the basement membrane and extracellular matrix organization leaving undamaged the collagen and elastin fibers⁶. It is made from a patented process that does not damage the crucial elements of the tissue structure allowing the structural integrity of the entire extracellular matrix from dermal substrate from which dead cells are eliminated

^{†††††} AlloDermTM, Lifecell Corp, Branchburg, NJ

after the freeze-drying process. The whole process is important for antigen destruction although a small risk of inflammatory or immune response by the host's recipient tissue or for disease transmission exists.^{6,7}

ADM, in medicine, has been used since 1990s, in burn victims^{6,7} and in esthetic and reconstructive plastic surgeries.⁸ In Dentistry, the ADM's use is recent and can be indicated in various periodontal procedures. Aichelmann-Reidy *et al.*⁹ and Novaes Jr *et al.*¹⁰, in clinical comparative studies, controlled and randomized studies, evaluated the ADM and the subepithelial connective tissue graft (SCTG) for root coverage. No clinically or statistically significant differences between the two techniques was shown after 6 months. Tal *et al.*¹¹ evaluated clinically the efficiency of ADM and STCG in the treatment of gingival recessions, and they did not find differences on root coverage between techniques.

Haeri & Parsell¹² compared the use of ADM and SCTG on gingival augmentation, and they did not observe differences on root coverage, clinical attachment gain or probing pocket depth. Woodyard *et al.*¹³, compared, in a 6-month study, the effect of ADM and coronally positioned flaps (CPF) on root coverage and gingival thickness and they verified a significant increase in gingival thickness in the ADM group.

The ADM can be used in the elimination of gingival melanin pigmentations. Novaes Jr. *et al.*¹⁴. related the effectiveness of ADM use in the reduction of gingival pigmentation, longer clinical maintenance and predictability of the results were obtained when compared to conventional methods. In soft tissue augmentation on edentulous ridges, Batista *et al.*,¹⁵ showed horizontal soft tissue gain and better esthetic results. Recently, Fowler *et al.*¹⁶ reported the

efficiency of the ADM as a barrier on guided bone regeneration and good results were obtained both on bone regeneration and on the esthetic result. Attending to this principle, Novaes Jr & Souza,¹⁷ observed the formation of adequate new bone and an increase in the width of keratinized tissue in recent alveoli, which was confirmed by Luczyszyn *et al.*,¹⁸ that on a study that evaluated, clinically and histologically the effect of the ADM on bone regeneration, concluded that the ADM was able to prevent ridge deformities after tooth extraction.

Advantages of using the ADM allograft as a substitute for the subepithelial connective tissue graft would be the unlimited quantity of material, decreased surgical time, reduction in discomfort, due to elimination of the donor surgical procedure, and decreased risk of postoperative complications.¹⁴ However, the absence of cells and vessels makes tissue incorporation slower if compared to the SCTG. Differently from autograft, that can be revascularized based on the anastomoses between blood vessels and those pre-existing in the graft, the allograft, as an acellular and avascular structure, depends on cells and blood vessels from the recipient site to achieve reorganization,^{6,15} showing that the cell-cell interactions and the vessel structure have influence on graft maturation.¹⁹ Based on these differences Barros *et al.*²⁰ proposed a modified surgical technique based on a extended flap to increase vascular nutrition, and cell source to improve its incorporation by the host's tissue.

In an attempt to solve these difficulties, the epithelial cell (keratinocytes) and fibroblasts cultures on the ADM has been investigated as an alternative to achieve early wound healing, improve incorporation, and decrease wound

contraction.²¹ However, the efficiency of cell incorporation throughou the matrix is still under investigation.

The ADM acts as a scaffold for host cells,²² and as a biologically compatible framework into which epithelial cells, keratinocytes, and fibroblasts can adhere, migrate, repopulate and incorporate the material into the newly formed tissue.¹⁷ Fibroblasts play an important role in wound healing and tissue repair. These cells accelerate the healing process because they appear at the injury site very fast and proliferate rapidly. These cells are responsible for the synthesis of a variety of growth factors, insulin growth factor (IGF), keratinocyte growth factor (KGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor (TGF), and cytokines involved on the healing process, in addition to extracellular matrix deposition and epithelial cells differentiation.¹⁹ Thus, in dermal equivalent, fibroblasts are responsible for keratinocyte differentiation and proliferation, as well as for basal membrane deposition by the keratinocytes from the basement stratum, that results on greater velocity and quality of the newly formed tissue.²³

Research on new alternatives to improve allograft incorporation and healing time, on soft tissue reconstruction or tissue augmentation in the mouth, are still limited. Then, the aim of this investigation was to verify, *in vitro*, different aspects related to human gingival fibroblasts seeding on to the ADM.

MATERIAL AND METHODS

Three healthy patients were selected to this study, non-smokers, without systemic diseases or periodontal disease or any other bucal infection that needed to be submitted to periodontal surgery which involves a healthy gingival tissue removal.

Protocol was approved by the Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto University of São Paulo's Human Research Committee (Protocol nº. 2007.1.1234.58.5).

Cell culture

Human gingival fibroblasts were seeded by the explant technique. The tissue removed were stored on a 50 mL falcon tube^{#####}, containing transport medium – Dubelcco's Modified Eagles Medium (DMEM)^{\$\$\$\$\$} 500 µg/mL of vancomycin, 250 µg/mL of gentamicin and 250 ng/mL of fungizone. After 3 washes of 15 minutes each with the medium, the tissue were placed in a Petri dish, sliced into 1-mm³ piece with a surgical blade and transferred to 25-cm³ flask", with DMEM supplemented with 10% Fetal Bovine Serum^{*****} (FBS) and 5µL/mL of vancomycin, 0.5 µL/mL of gentamicin and 0.2 µL/mL of fungisone in a humidified incubator at 37°C in a 5% CO₂ air atmosphere.

The medium was changed three times a week. After confluence, fibroblasts were detached from culture flasks by treatment with a solution of trypsin/EDTA at 0.05%⁺⁺⁺⁺⁺, followed by its inactivation with culture medium.

^{#####} Corning, NY

^{\$\$\$\$\$} Gibco, Gaithersburg, MD

["] Nunc, Roskilde, Denmark

^{*****} FBS, Hyclone, UT

⁺⁺⁺⁺⁺ Gibco, Gaithersburg, MD

Cells detached and inactivated were centrifuged for 3 minutes at 30000 rpm and the pellet formed suspended on a new culture medium. Fibroblasts from first to fourth passage were used in the experiment.

Tissue Culture

Primarily, following supplier instructions, the specimens were cut and washed with sterile saline solution on 50 mL flasks for 10 minutes. The specimens were washed with sterile saline solution until the protect paper flotation, after that the specimens were transferred to a new solution and this procedure repeated for two times more. A specimen of 20 X 40 mm was sliced into pieces of approximately 10 X 7 mm each. Before use they were adapted in the bottom of a well in a 24-well-plate and the cells were seeded at a density of 60000 cell/mL on the specimens. The cell density seeded on the MDA was determined under previously experiments where different cells seeding densities were compared (data not show). The specimens were carried out at 14 or 21 days post seeding.

Fibroblasts distribution on the ADM

To verify the fibroblasts distribution over the ADM a direct fluorescence microscopy labeling protocol for actin cytoskeleton and the nucleus detection were processed. After 14 and 21 days, the ADM + cells specimens, were removed from the well-plates and frozen on dry ice and mounted using Optimal Cutting Temperature (OCT) compound#####. Frozen specimens were sectioned at 10 μ m in a cryostat and the semi-serial sections adapted on a gel coverslip.

Tissue-Tek OCT; Miles Inc., Elkhat, IN

Freeze specimens were sliced into three different depth named border (B), transition (T) and center (C), which allow cell identification and their localization, whether at the surface (S) or inside (I) the ADM (Fig. 1). The coverslip with the freeze specimen were washed in buffer phosphate solution (PB) and the cells 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. Incubation was proceeded with Alexa Fluor 488\$\$\$\$\$ (green fluorescence, 1:200) conjugated phalloidin, was carried out in a humidified environment for 60 minutes at room temperature, for actin cytoskeleton detection/labeling. After PB rinsed, DAPI***** were incubated at 300 nM, for 5 minutes, to identify the nuclei in blue fluorescence. After mounted with an anti-fade kit##### the samples were then examined by using a fluorescence microscope under epifluorescence##### .

Cell Proliferation

Indirect immunofluorescence method was used to establish the percentage of cell in the cell cycling, by Ki-67 molecular localization on cellular nucleus.²⁴Hystochemical proceeding for Ki-67 labeling follows the same protocol described previously,²⁵ using a polyclonal human primary antibody anti-Ki-67\$\$\$\$\$ (1:70), followed by a secondary antibody goat anti-rabbit 594*****. (1:200).

\$\$\$\$\$ Molecular Probes, Eugene, OR

***** Molecular Probes, Eugene, OR

Vectashield, Vector Labs, Burlingame, CA

Leica, Benstein, Germany

\$\$\$\$\$ Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA

***** Molecular Probes, Eugene, OR

Cell Viability

Cell viability was determined by flow cytometry with anexina V ^{††††††††} and propidium iodeto (PI)^{#####} staining. To cell isolation from ADM surface and inner, the specimens were submitted to 9.5 mL of trypsin in 0.25%, 500 µL collagenase^{\$\$\$\$\$\$} and 500 µL EDTA for 15 min in a humidified incubator at 37°C in a 5% CO₂ air atmosphere. All process was inactivated in 2.5ml of culture medium and centrifuged for 10 min at 2000 rpm. Cells were suspended on a 445 µL of buffer solution ligand. Anexin V was incubated for 10 min on ice and dark. PI at 50 µL, at 100µg/ml, was added to labeling non viable. Anexin V is specific for apoptosis pathway, and PI for the non viable cells.

Statistical Analysis

Data presented in this work are the representative results of three separate experiments in cell culture established from three different donors. All experiments were carried out in triplicate (n=3). Comparisons were performed using the nonparametrical Mann-Whitney U Test, for independent samples (level of significance: 5%).

RESULTS

Fibroblast distribution on the ADM

Epifluorescence revealed that, at day 7, fibroblasts were adherent and spread on the ADM surface, and were unevenly distributed, forming a discontinuous single cell layer (Fig. 2, A and B). At day 14, a confluent

^{†††††††} Dako, Golstrup, DK

^{#####} Sigma Chemical CO, St. Louis

^{\$\$\$\$\$\$} Gibco, Gaithersburg, MD

fibroblastic monolayer lining ADM surface was noticed (Fig. 2, C and D), whose cells exhibited an elongated shape and the actin cytoskeleton assembled into stress fibers. At this time interval, rare cells were observed inside the ADM, mostly in the border slices and in areas of low collagen fiber bundle density. At day 21, the organization of the cell monolayer did not alter compared to day 14, despite the reduction in cell density (Fig. 2E).

Table 1 shows the mean number of adherent cells on different ADM slices, named border (B), transition (T) and central (C), and their localization, whether at the surface (S) or inside (I) the ADM (Fig. 1). At day 14 a higher number of cells was observed inside the ADM on the border slices compared to the central ones (41.1% and 2.5%, respectively).

At day 21, total cell number at the ADM surface was reduced compared to day 14 ($BS_{d14}= 41.1\%$, $BS_{d21}= 29.7\%$). However, on the central slices, the cell number was higher ($CI_{d14}= 2.5\%$; $CI_{d21}= 4.3\%$).

Cell Proliferation

At 7 days, about 90% of adherent cells at the ADM surface exhibited Ki-67 nuclear labeling (Fig. 2B). However, the number of Ki-67 positive cells at 14 and 21 days was significantly reduced (Fig. 2, D and F, respectively; D, arrowhead). Table 2 shows the proportions of cycling cells on the ADM surface or inside the matrix. No statistically significant difference was observed between 14 and 21 days.

Cell Viability

High proportions of viable cells were detected on the ADM surface at days 14 and 21 (96.4% and 94.9%, respectively; Fig. 3), with no statistically significant difference between both time points. No significant differences as to the apoptotic index were observed between days 14 and 21 (19.5% and 22.7%, respectively, Fig. 4).

DISCUSSION

The present study evaluated the seeding of gingival fibroblasts onto the ADM, aiming to create *in vitro* a hybrid scaffold that could be able to reduce the inflammatory and the wound healing events *in vivo*, ultimately improving tissue reorganization and neoangiogenesis. While at day 7 fibroblasts were adherent and spreaded on the ADM surface, forming a discontinuous single cell layer, at day 14 the monolayer was confluent, exhibiting mostly non-cycling cells with an elongated shape. At day 21, the cell monolayer exhibited a reduction in cell density. Only rarely were cells observed inside the ADM throughout the culture interval.

Bell *et al.*²⁶ were the first to describe three-dimensional collagen matrices with autologous skin fibroblasts in the construction of a dermal-like tissue. This led to the observations that fibroblasts behavior *in vitro* in collagen matrices is closer to the *in vivo* situations with respect to cell morphology,²⁷ protein synthesis,²⁸ enzyme expression,^{29,30} and also the regulation of cell growth.³¹

In the present study, epifluorescence revealed fibroblasts adherent and spreaded on the ADM surface, exhibiting actin stress fibers. It is well known that cell-matrix interactions regulate cell growth, migration, differentiation, survival, tissue organization and matrix remodeling.^{32,33} The cell distribution on the scaffold and its proliferative rate are key aspects for tissue engineering using hybrid constructs.³⁴ The formation of a cell monolayer lining the ADM surface at day 14 was probably due to the reduced migration throughout the ADM scaffold. The dense architecture of the ADM seemed to limit cell penetration in its structure and, therefore, cell proliferation and migration took place mostly on its outer surface, where cells could adhere and spread. Similar results were described by Ojhe *et al.*,³⁵ using a dermal equivalent reminiscent of ADM. However, these characteristics are not restricted to dermal matrices. Hillmann *et al.*,³⁶ 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 homogenously throughout the scaffold with a loose fibrillar structure.

Maasser *et al.*³⁷ showed that fibroblast migration in 3-D collagen matrices requires cell adhesion and matrix remodeling. 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 during the culture interval cells were unable to alter the dense organization of the collagen bundles, which acted as a physical barrier. Even if long-term cell cultures could allow the cells to modify the collagen structure and penetrate the ADM, it should be taken into consideration that the cell contact inhibition that takes place as the fibroblastic monolayer reaches confluence triggers the apoptosis pathway,^{38,39}

therefore reducing the number of viable cells. Moreover, relevant phenotypic changes can occur in long-term cell culture,⁴⁰ which could have an impact in the graft quality.

In cell cultures, increasing cell number depends on the establishment of cell to cell interactions, which for fibroblasts limit cell proliferation and induce its exit from the cell cycle.³⁸ Indeed, while at day 7 the majority of non-confluent fibroblasts were cycling cells, at days 14 and 21 the monolayer exhibited reduced cell proliferation rate, a finding consistent with the results obtained by Mio *et al.*⁴¹ and Hillmann *et al.*⁴² Croce *et al.*⁴³ observed that human dermal fibroblasts cultured into layered collagen fibrils exhibited a significantly lower proliferation rate when compared to cells grown on plastic surfaces. Schor⁴⁴ reported that the reason for the slower growth of fibroblasts within the collagen matrix could be due to several factors, including the availability of nutrients. Thus, the low porosity and poor pore interconnectivity in the ADM could decrease diffusion of nutrients and consequently impair cell migration throughout the matrix, restricting the cell growth to the surface.

ADM is an important source of collagenous and non-collagenous extracellular matrix proteins, which has been used as a scaffold for fibroblasts to adhere, spread, proliferate, and migrate. In addition, the growth of fibroblasts on the ADM *in vitro* allows these cells to synthesize and release growth factors, which can be sequestered into the matrix and be eventually available in the *in vivo* environment,⁴⁵ therefore contributing to the ADM revascularization and wound healing.

In conclusion, the 14-day culture of gingival fibroblasts on the ADM seems to be ideal to support cell growth and the formation of a confluent

monolayer on the matrix surface, characterized by mostly viable, non-cycling fibroblasts. The use of a hybrid ADM scaffold *in vivo* would promote a quick revascularization¹⁹, greater amount of keratinized gingival epithelium,⁴⁶⁻⁴⁸ and less patient discomfort. For tissue engineering applications, our data indicate that fiber bundle arrangement should be modified without altering the ADM functionality and durability, aiming to allow cell migration and colonization throughout the entire matrix.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the State of São Paulo Research Foundation, São Paulo, SP, Brazil (grant 2006/03063-0 to Dr. Palioto). Dr Rodrigues was supported by a scholarship from the Coordination for the Improvement of Graduated Personnel. The authors also acknowledge the kind assistance of Roger Rodrigo Fernandes and Júnia Ramos laboratory technicians, Cell Culture Laboratory, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil.

REFERENCES

- 1- Cummings LC, Kaldahl WB, Allen EP. Histologic evaluation of autogenous connective tissue and acellular dermal matrix grafts in humans. *J Periodontol* 2005; 76: 178-186.
- 2- Branham GH, Thomas JR. Skin grafts. *Otolaryngol Clin North Am* 1990; 23: 889-897

- 3- Ophof R, van Rheden REM, Von den Hoff JW, Schalkwijk J, Kuijpers-Jagtman AM. Oral Keratinocytes cultured on dermal matrices form a mucosa-like tissue. *Biomaterials* 2002; 23: 3741-3748.
- 4- Bouchard P, Etienne D, Ouhayoun J, Nilveus R. Subepithelial connective tissue graft in the treatment of gingival recession. A comparative study of two procedures. *J Periodontol* 1994; 65: 929-936.
- 5- Borguetti A, Louise F. Controlled clinical evaluation of the subpedicle connective tissue graft for the coverage of gingival recession. *J Periodontol* 1994; 65: 1107-1112.
- 6- Wainwright DJ. Use of an acellular dermal matrix (AlloDermTM) in the management of full-thickness burns. *Burns* 1995; 21: 243-248.
- 7- Livesey SA, Herndon DN, Hollyoak MA, Atkinson YH, Nag A. Transplanted acellular allograft dermal matrix. Potential as a template for the reconstruction of viable dermis. *Transplantation* 1995; 60: 1-9.
- 8- Achauer BM, VanderKam VM, Celikoz B, Jacobson DG. Augmentation o facial soft tissue defects with Alloderm dermal graft. *Ann Plast Surg* 1998; 56: 722-727.
- 9- Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA, Evans GH, Nasr HF, Mayer ET. Clinical evaluation of acellular allograft dermis for the treatment of human gingival recession. *J Periodontol* 2001; 72: 998-1005.
- 10-Novaes Jr AB, Grisi DC, Molina GO, Souza SLS, Taba Jr M, 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(11): 1477-84.

- 11-Tal H, Moses O, Zohar R, Meir H, Nemcovsky C. Root coverage of advanced gingival recession: A comparative study between acellular dermal matrix allograft and subepithelial connective tissue grafts. *J Periodontol* 2002; 73: 1405-1411.
- 12-Haeri A, Parsell D. Creeping attachment: autogenous graft vs. dermal matrix allograft. *Compendium* 2000; 21: 725-730.
- 13-Woodyard JG, Greenwell H, Hill M, Drisko C, Iasella JM, Scheetz J. The clinical effect of acellular dermal matrix on gingival thickness and root coverage compared to coronally positioned flap alone. *J Periodontol* 2004; 75: 44-56.
- 14-Novaes Jr AB, Pontes CC, Souza SLS, Grisi MFM, Taba Jr. M. The use of acellular dermal matrix allograft for the elimination of gingival pigmentation: case representation with 2 years of follow-up. *Prect Proced Aesthet Dent* 2002; 14(8): 619-623.
- 15-Batista Jr EL, Batista FC, Novaes Jr AB. Management of soft tissue ridge deformities with acellular dermal matrix. Clinical approach and outcome after 6 months of treatment. *J Periodontol* 2001; 72: 265-273.
- 16-Fowler BF, Lawrence GB, Rebitski G. Ridge preservation utilizing an acellular dermal allograft and desmineralized freeze-dried bone allograft: Part I. A report of 2 cases. *J Periodontol* 2000; 71: 1353-1359.
- 17-Novaes Jr AB, Souza SLS. Acellular dermal matrix graft as a membrane for guided bone regeneration: A case report. *Implant Dent* 2001; 10(3): 192-196.
- 18-Luczyszyn SM, Papalexiou V, Novaes Jr AB, Grisi MFM, Souza SLS, Taba Jr M. Acellular dermal matrix and hidroxyapatite in prevention of ridge deformities after tooth extraction. *Implant Dent* 2005; 14(2): 176-184.

- 19-Erdag G, Sheridan RL. Fibroblasts improve performance of cultured composite skin substitute on athymic mice. *Burns* 2004; 30: 322-328.
- 20-Barros RRM, Novaes Jr AB, Grisi MFM, Souza SLS, Taba Jr M, Palioto DB. A 6-month comparative clinical study of a conventional and new surgical approach for root coverage with acellular dermal matrix. *J Periodontol* 2004; 75: 1350-1356.
- 21-Lamme EN, Van Leeuwen RT, Brandsma K, Marle JV, Middelkoop E. Higher numbers of autologous fibroblasts in an artificial derma substitute improve tissue regeneration and modulate scar tissue formation. *J Pathol* 2000; 190(5): 595-603.
- 22-Herson MR, Mathor MB, Altran S, Capelozzi VL, Ferreira MC. In vitro construction of a potential skin substitute through direct human keratinocyte plating onto decellularized glycerol-preserved allografts. *Artif Organs* 2001; 25(11): 901-906.
- 23-Okamoto E, Kitano Y. Expression of basement membrane components in skin equivalents- influence of dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci* 1993; 5(2): 81-88.
- 24-Scholzen T, Gerdes J. The ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311-322.
- 25-De Oliveira PT, De Oliva MA, Maximiano WMA, Sebastião KEV, Crippa GE, Ciancaglini P, Beloti MM, Nanci A, Rosa AL. Effects of a mixture of growth factors and proteins on the development of the osteogenic phenotype in human alveolar bone cell cultures. *J Histochem Cytochem* 2008; Epub ahead of print.
- 26-Bell E, Ivarson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 1979; 76(3): 1274-1278.

- 27-Bell E, Sher S, Hull B, Merrill C, Rosen S, Chamson A, Asselineau D, Dubertret L, Coulomb B, Lapiere C, Nusgens B, Neveux Y. The reconstruction of a living skin. *J Invest Dermatol* 1983; 81: 2-10.
- 28-Nusgens B, Merrill C, Lapière C, Bell E. Collagen biosynthesis by cells in a tissue equivalent matrix in vitro. *Collagen Related Res* 1984; 4: 351-364.
- 29-Coulomb B, Dubertret L, Bell E, Merrill C, Fosse M, Breton-Gorius J, Prost C, Touraine ER. Endogenous peroxidases in normal human dermis: a marker of fibroblasts differentiation. *J Invest Dermatol* 1983; 81: 75-78.
- 30-Colige AC, Lambert CA, Nusgens BV, Lapière CM. Effect of cell-cell ad cell-matrix interactions on the response of fibroblasts to epidermal growth factor in vitro. *Biochem J* 1992; 285: 215-221.
- 31-Sarber R, Hull B, Merrill C, Soranno T, Bell E. Regulation of proliferation on fibroblasts of low and high population doubling levels grown in collagen lattices. *Mech Ageing Dev* 1981; 17: 107-117.
- 32-Bromberg BE, Song IC. Pig skin heterografts. *Minn Med* 1965; 48(12): 1605-1609.
- 33-Wang HJ, Chou TD, Tsou TL, Chen TM, Chen SL, Chen SG, Wei LG, Yeh KJ, Ko YH, Wang CS, Lee WH. The application of new biosynthetic artificial skin for long-term temporary wound coverage. *Burns* 2005; 31: 991-997.
- 34-Ng KW, Khor HL, Hutmacher DW. In vitro characterization of natural and synthetic dermal matrices cultured with human dermal fibroblasts. *Biomaterials* 2004; 25: 2807-2818.
- 35-Ojeh NO, Frame JD, Navsaria HA. In vitro Characterization of an artificial dermal scaffold. *Tissue engineering* 2001; 7(4): 457-472.

- 36-Hillmann G, Steinkamp-Zucht A, Geurtsen W, Gross G, Hoffmann A. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. *Biomaterials* 2002; 23: 1461-1469.
- 37-Masser K, Wolf K, Klein CE, Niggemann B, Zanker KS, Brocker EB, Friedl P. Functional hierarchy of simultaneously expressed adhesion receptors: integrin alpha₂beta₁ but not CD44 mediates MV3 melanoma cell migration and matrix reorganization within three-dimensional hyaluronan-containing collagen matrices. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 3067-3079.
- 38-Holley RW. Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature* 1975; 11(258): 487-490.
- 39-Ruoslahti E, Obrink B. Common Principles in Cell Adhesion. *Experimental Cell Res* 1996; 227: 1-11.
- 40-Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol* 1994; 124: 401-404.
- 41-Mio T, Adachi Y, Romberger DJ, Ertl RF, Rennard SI. Regulation of fibroblast proliferation in three-dimensional collagen gel matrix. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1996; 32(7): 427-433.
- 42-Hillmann G, Gebert A, Geurtsen W. Matrix expression and proliferation of primary gingival fibroblasts in a three-dimensional cell culture model. *J Cell Sci* 1999; 112: 2823-2832.
- 43-Croce MA, Silvestri C, Guerra D, Carnevali E, Boraldi F, Tiozzo R, Parma B. Adhesion and proliferation of human dermal fibroblasts on collagen matrix. *J Biomater Appl* 2004; 18: 209-222.
- 44-Schor SL. Cell proliferation and migration on collagen substrata in vitro. *J Cell Sci* 1980, 41: 159-175.

45-Gentskow G, Jensen J, Pollak R *et al.* Improved healing of diabetic foot ulcers after grafting with a living human dermal replacement. *Wounds* 1999; 11(3); 77-84.

46-Pini Prato GP, Rotundo R, Magnani C, Soranzo C, Muzzi L, Cairo F. An autologous cell hyaluronic acid graft technique for gingival augmentation: A case series. *J Periodontol* 2003; 74: 262-267.

47-McGuire KM, Nunn ME. Evaluation of a safety and efficacy of periodontal applications of a living tissue engineered human fibroblast-derived dermal substitute. I. Comparison to the gingival autograft: a randomized controlled pilot study. *J Periodontol* 2005; 76: 867-880.

48-Mohammadi Y, Soleimani M, Fallahi-Sichani M, Gazme A, Haddadi-Asl V, Arefian E, Kiani J, Moradi R, Atashi A, Ahmadbeigi N. Nanofibrous poly(epsilon-caprolactone)/poly (vinyl alcohol)/ chitosan-hybrid scaffold for bone tissue engineering using mesenchymal stem cells. *Int J Artif Organs* 2007; 30: 204-211.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Scheme from the specimen sections according to cell distribution on the ADM and cell localization.

Fig. 2. Epifluorescence of human gingival fibroblast cultures on the ADM (indicated by a asterisc on A) at 7 days (A and B), 14 days (C and D) and 21 days (E and F), staining by phalloidin (green fluorescence) and DAPI (blue fluorescence), to actin cytoskeleton and nucleus observation, respectively. On B, D and F, Ki-67 nuclear labeling, represented in magenta as a result of the superimposition of red (Ki-67) and blue (DAPI) fluorescence. Note: on A and B, fibroblasts were adherent and spreadED on the ADM surface, and were unevenly distributed, forming a discontinuous single cell layer; on C and D, a confluent fibroblastic monolayer lining the ADM surface was observed, on E and F, lower cell density is seen. Detail on B shows the prevalence of cells at the cell cycling (positive to Ki-67) at day 7, which were just occasionally seen at day 14 (Fig. 2 D and F, respectively; D arrowhead) and at day 21. Objectives from 20X (A, C, D, E, F), 10X (B) e 30X (Detail). Bar of equal value of 100 µm (A, C, D, E and F), 50 µm (B) e 75 µm (Detail).

Fig. 3. *In vitro* cell viability in human fibroblastic cells derived from human gingival tissue cultured on the ADM evaluated at 14 and 21 days. Data are reported as mean and standard deviation (n=3).

Fig. 4. *In vitro* cell apoptosis rate of human gingival fibroblastic cells derived from human gingival tissue cultured on the ADM evaluated at 14 and 21 days. Data are reported as mean and standard deviation (n=3).

Fig. 1

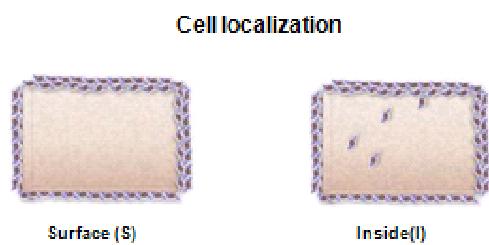
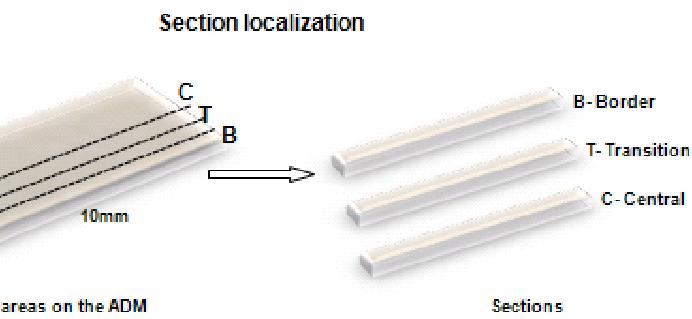


Fig. 2

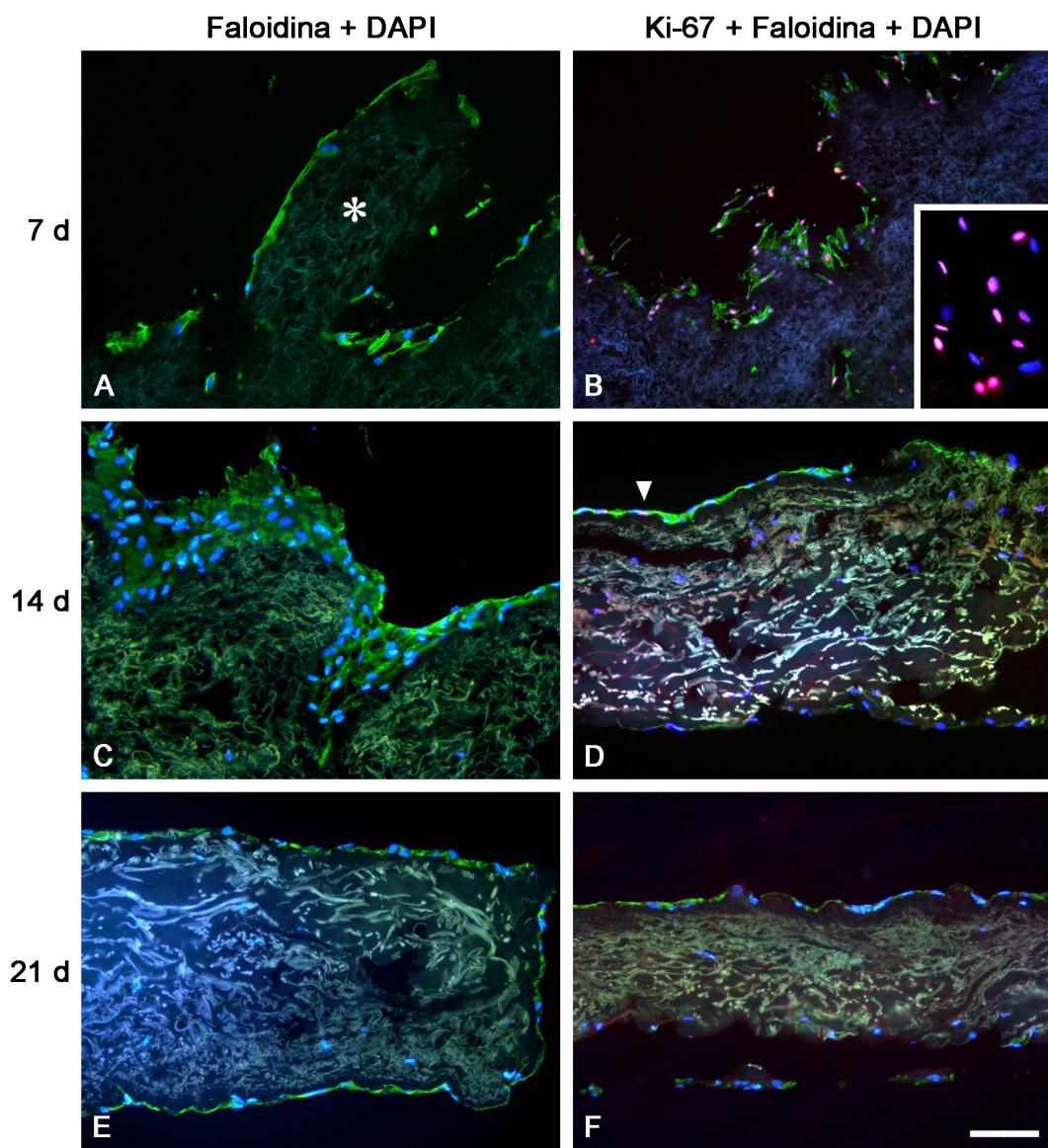


Fig. 3

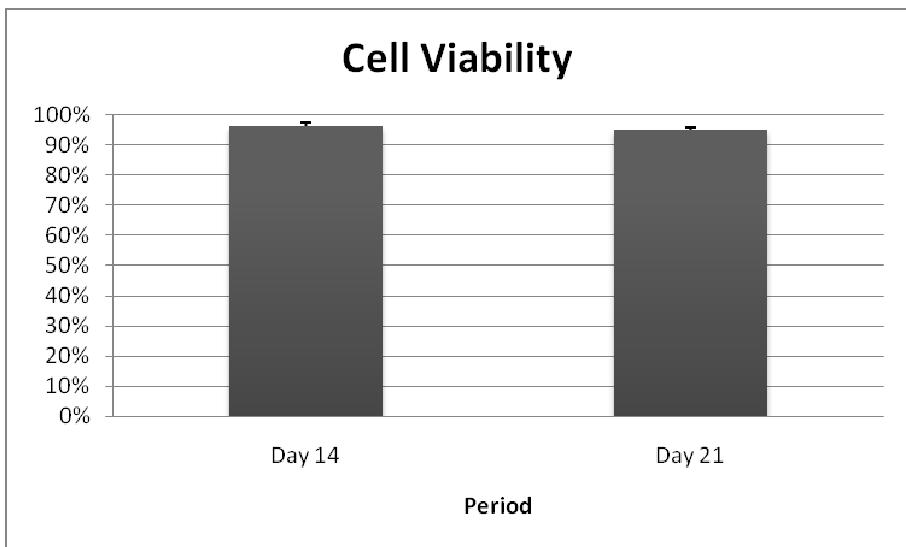


Fig. 4

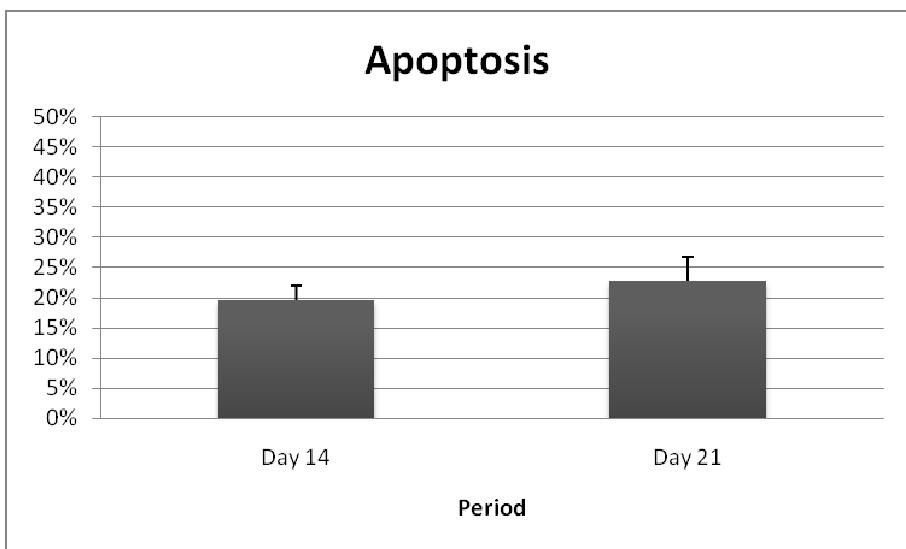


Table 1.

Relative proportions of fibroblasts adherent to the surface of and migrated into the ADM scaffold at days 14 and 21

	Day 14		Day 21		p- value
	Mean	Median (range)	Mean	Median (range)	
BI	16.5	10.2 (8.7-30.6)	13.3	14 (8-18)	0.5
BS	41.1	33(28.4-62)	29.7	24.3 (24-41)	0.2
TI	5.1	5 (4-6.4)	7.6	6 (4-13)	0.42
TS	20.6	19.6 (16.1-26)	29%	31 (24-32)	0.1
A	2.5	3.4 (0.7-3.5)	4.3	4 (4-5)	0.05*
CS	14.1	10.4 (5-27)	15.6	11 (8-28)	0.35

Mann- Whitney U-test. * Statistically significant at p≤0.05.

Table 2.**Relative proportion of fibroblasts in the cell cycle by Ki-67 immunostaining on the ADM**

	Day 14		Day 21		p- value
	Mean	Median (range)	Mean	Median (range)	
B	0.7	0.6 (0.4-1)	0.7	0.6 (0-1.6)	0.57
BS	2.3	2.5 (1.3-3.5)	1.9	1.1 (0-4.7)	0.35
T	0.5	0.5 (0.4-0.8)	0.4	0.5 (0.2-0.5)	0.35
TS	0.9	0.6 (0.4-1.8)	1.2	0.7 (0.3-2.7)	0.5
C	0%	0 (0-0.2)	0.4	0.5 (0.2-0.6)	0.07
CS	0.3	0 (0-0.9)	0.7	0.7 (0-1.4)	0.35

Mann- Whitney U-test. * Statistically significant at p≤0.05.